„Zeitschrift für Vitamin-, Hormon und Fermentforschung“
Sonderdruck aus Band XI (1960), Heft 2/3
Verlag Urban & Schwarzenberg Ges m. b. H., Wien IX/72, Frankgasse 4

Der wörtliche Abdruck von Publikationen dieser Zeitschrift ist untersagt. — Referate und Zitate mit Quellenangabe sind gestattet.

Fred Leuschner

Untersuchungen über die Wirkung des Vasopressins und analoger Polypeptide auf die Niere

Medizinische
Habilitationsschrift
Erlangen

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. F. H e i m)

Untersuchungen über die Wirkung des Vasopressins und analoger Polypeptide auf die Niere

Von

Fred Leuschner

Mit 17 Abbildungen und 7 Tabellen

Inhaltsverzeichnis

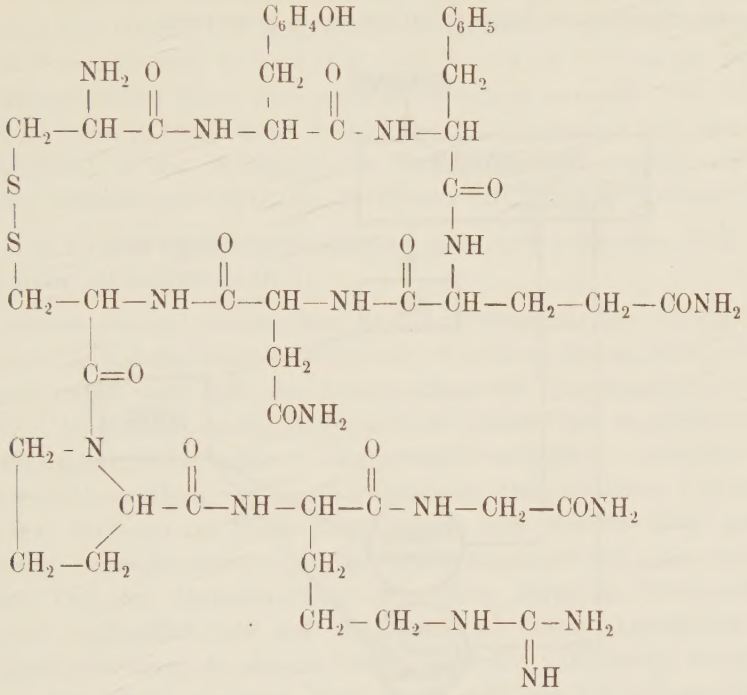
Seite

Einleitung 98
Methodik 105
A. Biologische Bestimmung des antidiuretischen Hormons 105
B. Durchströmung der Meerschweinchenniere 115
C. Fraktionierung des Nierenhomogenates in 0,44 m Rohrzuckerlösung zur Bestimmung antidiuretischer Polypeptide 115
D. Gewinnung von Nierenmitochondrien für Stoffwechselversuche 116
E. Messung der Mitochondrienschwellung 117
F. Bestimmung des Kalium- und Natriumgehaltes in Mitochondrien . . . 117
G. Bestimmung des ATP-Gehaltes in Mitochondrien 118
H. Antidiuretische Substanzen 119
I. Statistische Beurteilung der Untersuchungsergebnisse 119
Ergebnisse 120
A. Oxypressin-Aufnahme von der isolierten Niere 120
B. Oxypressin-Gehalt in der Niere und Ausscheidung mit dem Harn . . . 123
C. Verteilung von Oxypressin in der Niere 125
D. Hemmung der osmotischen Schwellung durch Oxypressin 128
E. Abhängigkeit der Oxypressin-Wirkung vom osmotischen Druck der Suspensionsflüssigkeit 132
F. Oxypressin-Wirkung und Alterung der Mitochondrien 134
G. Oxypressin-Wirkung und Oxypressin-Gehalt im Mitochondrienansatz . . 135
H. Veränderungen des Kalium-, Natrium- und ATP-Gehaltes während der Hemmung der osmotischen Schwellung durch Oxypressin 136
Besprechung 138
Schlußbetrachtungen 149
Zusammenfassung 152
Literatur 156

Einleitung

Die Frage nach dem zellulären Wirkungsmechanismus der Hormone hat bei den niedermolekularen Vertretern dieser Stoffklasse (z. B. bei den Nebennierenrindenhormonen und beim Thyroxin) eine relativ schnelle und befriedigende Beantwortung gefunden. Für das Verständnis vieler physiologischer und pathologischer Reaktionsab

läufe waren diese Erkenntnisse von grundlegender Bedeutung. Entsprechendes kann von den höhermolekularen Hormonen noch nicht gesagt werden — sieht man von der Rolle des Insulins im Zuckerstoffwechsel ab, die im übrigen in Einzelheiten noch absolut unge-



Die Strukturformel von Vasopressin (Rind).

klärt ist. Auch über den feineren Zellmechanismus des Vasopressins* in der Niere fehlen genaue Kenntnisse.

V ist ein Hormon, das an der Regulation der Isotonie im Organismus beteiligt ist. Der osmotische Druck der extrazellulären Flüssigkeit, also des Blutes und der Interstitialflüssigkeit, gehört zu den sorgfältig ausbalancierten Größen im Organismus. Die Aufnahme von Wasser und osmotisch aktiven Bestandteilen aus der Nahrung beeinflußt diesen Druck ebenso wie deren Ausscheidung mit Harn, Stuhl, Atemluft und Schweiß. Nicht unerhebliche Bedeutung hat der Stoffaustausch zwischen dem intra- und extrazellulären Raum. Störungen des osmotischen Drucks werden vom Organismus vor allem durch das empfindliche Ausscheidungssystem der Niere aufgefangen.

* Folgende Abkürzungen werden gebraucht: Vasopressin = V, Oxypressin = O, Adenosin-5′-triphosphorsäure = ATP, Adenosintriphosphatase = ATPase.

BIBLIOTHEK LEIDEN

Dort ist neben hämodynamischen Veränderungen die Wasser- und Natriumrückgewinnung im ableitenden Tubulusapparat eine entscheidende Funktion. Ein Teil dieser Rückgewinnung wird hormonal gesteuert. Dort greift V vermutlich an.

In den vergangenen Jahrzehnten wurden wichtige Erkenntnisse über die allgemeinen Eigenschaften des V gewonnen.

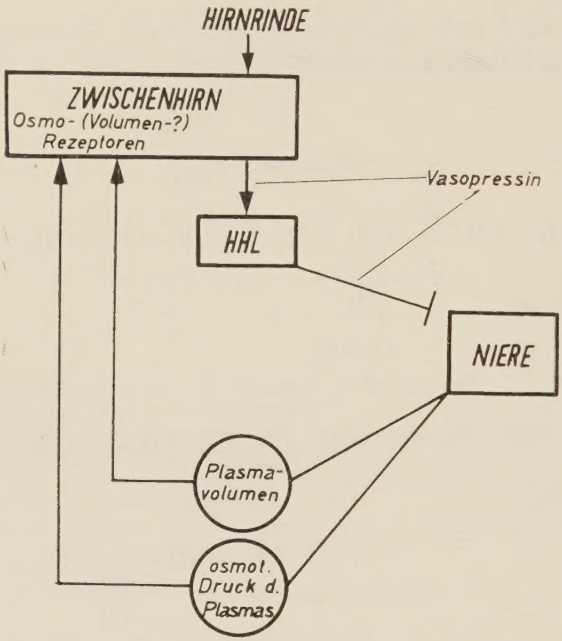


Abb. 1.

Einblick in die chemische Natur des Hormons vermittelten Untersuchungen, vor allem von Du Vigneaud [1–17] und seinen Mitarbeitern. Diesem Arbeitskreis ist es gelungen, die Struktur aufzuklären und sogar die Synthese durchzuführen. Die nachstehende Formel ist einer Arbeit von Du Vigneaud, Lawler und Popenoe [17] entnommen.

Probleme über den Bildungs- und Sekretionsort des V wurden von mehreren Arbeitsgruppen in Deutschland und Amerika näher untersucht [18–31]. Sie führten zu der Erkenntnis, daß der Hypothalamus der Bildungsort des Hormons ist und die Hypophyse als Speicher- und Sekretionsort betrachtet werden kann.

Das Hormon wird aus der Hypophyse freigesetzt, wenn der effektive osmotische Druck des Plasmas ansteigt. Auf die V-Abgabe haben wahrscheinlich auch das Plasmavolumen, emotionelle Zustände

und Pharmaka einen Einfluß. Verney[32] hat zeigen können, daß schon bei geringer Erhöhung des osmotischen Druckes im Blute Osmorezeptoren erregt werden, die im Ausbreitungsgebiet der A. car. int. liegen und die Freisetzung und Bildung des V auslösen.

V vermindert die Harnausscheidung bei gleichzeitiger Konzentrierung des Harns. Der Angriffspunkt ist dabei vor allem die Niere — wie Versuche von Starling und Verney[32–34] an der isolierten überlebenden Niere überzeugend beweisen konnten. Die V-Wirkung ist auch in erster Linie humoraler Natur, denn es ließ sich kein Unterschied in der Wirkung von Hypophysenhinterlappen-Extrakt auf die normal innervierte und die denervierte Niere nachweisen[35, 36].

Auf Grund dieser Erkenntnisse läßt sich folgendes Bild vom V-System entwerfen (Abb. 1).

Bisher wurde nichts über den Angriffspunkt des V in der Niere mitgeteilt. Hier beginnt der unsichere Boden. Viele Untersucher haben sich um die Lokalisation der Hormonwirkung bemüht[37–41]. Diese — unter teilweise sehr schwierigen experimentellen Bedingungen erarbeiteten — Ergebnisse vermitteln eigentlich nur eine gute Vorstellung von den Nierenabschnitten, in denen V offenbar nicht wirksam ist. Diese Experimente sind deshalb nicht nutzlos gewesen, vielmehr lenkten sie die Aufmerksamkeit auf einen funktionellen Teil der Harnbereitung, der einer direkten Untersuchung schwer zugänglich ist, auf die distalen Tubulusabschnitte und die Sammelröhren. In diesen Teilen wird die V-Wirkung heute mit großer Sicherheit vermutet. Jedoch gilt dies nur für höhere Glieder der Wirbeltierreihe, niedere — z. B. Reptilien — zeigen eine Antidiurese, deren Ursachen veränderte Filtrationsbedingungen in den Glomeruli sind. Zum wesentlichen Teil wurde die Lokalisation der V-Wirkung durch Mikropunktion der proximalen Tubulusteile und der distalen Sammelröhren, durch Clearence-Untersuchungen und vergleichende Bestimmungen von Harnmenge und Nierendurchblutung angestrebt.

Die Möglichkeit des tubulären Angriffs gewinnt durch einige interessante Argumente von Burgess, Harvey und Marshall[42] an Wahrscheinlichkeit. Diese Autoren fanden durch vergleichende Untersuchungen an Wirbeltieren nur bei den Tierarten eine Antidiurese mit normalen glomerulären Verhältnissen, die einen engen Teil der Henle schen Schleife — also distale Tubulusabschnitte — besitzen. Auch histologische Untersuchungen von Darmady[43] an Patienten mit lokalisierten Schäden in den

Sammelröhren und distalen Tubulusabschnitten lassen sich gut mit dem tubulären Angriffspunkt vereinbaren.

Wie könnte man sich die Konzentrierung des Harns durch V vorstellen?

Der größte Teil des Wassers aus dem glomerulären Filtrat—87% von 180—200 Litern beim Menschen — gelangt im proximalen Tubulusabschnitt in die Kapillaren. Dieses Wasser passiert das Tubulusepithel passiv — einem osmotischen Gradienten folgend, der vor allem durch aktiven Transport von Natrium, Bicarbonat und Chlorid entsteht. Diese Wasserbewegung ist obligatorisch und untersteht nicht der V-Kontrolle. Die restlichen 13% des Filtrates enthalten vor allem Stoffe, die ausgeschieden werden sollen. Osmotischer Druck und Reaktion dieser Flüssigkeit stimmen weitgehend mit den Eigenschaften des Plasmas überein. — Im distalen Schenkel des Tubulus und in den Sammelröhren muß nun aus dieser Flüssigkeit der Endharn unter Entnahme einer wechselnden Menge Wasser bereitet werden. Dabei wird der Harn mehr oder weniger stark konzentriert (1,001—1,035). Das Ausmaß dieser Wasserentnahme hängt vom Flüssigkeitsbedürfnis des Organismus ab. Nur für diesen Wassertransport — häufig fakultativ genannt —, wird eine Kontrolle durch V angenommen.

Die Wasserentnahme aus den distalen Tubuli ist grundsätzlich auf zwei Arten möglich: Das Wasser kann in das Gewebe zurückresorbiert werden oder zurückdiffundieren. Im ersten Fall verfügt der Organismus im V über einen Stoff, der die Leistung der Tubulusepithelien erheblich steigern kann, denn die Rückresorption ist ein aktiver energieverzehrender Prozeß. Die zweite — eine passive Möglichkeit könnte V durch Permeabilitätsänderung der Tubulusepithelien — z. B. durch Porenerweiterung — erreichen.

Über die Bildung des Endharns existieren mehrere Hypothesen, in denen zum Teil passiver oder aktiver Wassertransport unter V angenommen wird.

Die eine dieser Hypothesen stammt von West, Kaplan, Fomon und Rapoport[44]. Sie postuliert, daß die Rückresorptions- und Sekretionsprozesse der gelösten Bestandteile isosmotisch verlaufen und dort beendet sind, wo V zu wirken beginnt. Am Beispiel des Menschen würde das bedeuten, daß in den proximalen Abschnitten des Nephrons das Glomerulusfiltrat bis auf 2 ml isotonischen Tubulusharn pro Minute reduziert würde. Im distalen Abschnitt würde nun unter V ein weiterer Teil des Wassers aktiv zurückresorbiert werden.

Eine Theorie aus dem Arbeitskreis um Smith [45, 46] geht ebenfalls von der Annahme aus, daß proximal etwa $^{7}/_{8}$ des filtrierten Wassers passiv zurückdiffundiert, hinter den Stoffen, die aktiv resorbiert werden. Eine leichte Hypotonie, die dabei auftreten kann, wird bis zur Henleschen Schleife wieder ausgeglichen. In einem weiter distal liegenden Teil wird nun eine vom antidiuretischen Hormon unabhängige, gleichbleibende Natriumrückresorption angenommen. Diese verläuft in Abwesenheit von V „trocken" — also ohne das gleichzeitig Wasser durch das Epithel diffundiert. In diesem Fall entsteht der hypotonische Harn der maximalen Wasserdiurese, deren Menge $^{1}/_{7}$ des glomerulären Filtrats beträgt. Bei der Injektion einer zunächst geringen Menge V diffundiert Wasser mit dem osmotisch aktiven Natrium aus den Tubuli; V hebt gleichsam eine Diffusionssperre auf. Der Harn wird dabei isotonisch. Bei maximaler Antidiurese durch große Dosen V wird schließlich noch weiter distal — möglicherweise in den Sammelröhren — eine weitere Menge Wasser aktiv zurückresorbiert. Dabei entsteht ein hypertonischer Harn. — Diese Theorie hat den Nachteil, daß sie zwei Mechanismen für V annimmt: Anfangs zur Bereitung des isotonischen Harns einen passiven, später in den Sammelröhren einen aktiven Prozeß.

Die dritte Theorie, die von Kuhn, Hargitay und Wirz [47–51] entwickelt wurde — auf sie soll später ausführlich eingegangen werden —, nimmt eine passive Wasserdiffusion unter V an.

Experimentelle Beweise für diese Theorien wurden vor allem in physiologischen Untersuchungen — z. B. durch Mikropunktion der Niere und Clearence-Bestimmungen — gesucht. Die unzugängliche Lage der distalen Tubuli verhinderte bisher jede sichere Entscheidung für die eine oder andere Theorie.

In den letzten Jahrzehnten hat sich ein neuer Weg abgezeichnet, auf dem zelluläre Wirkungsmechanismen, die vermutlich auch der V-Wirkung in der Niere zugrunde liegen, untersucht werden können: Pharmokologische und physiologische Stoffe werden an vorgebildeten subzellulären Partikeln geprüft, mit denen Teilfunktionen der Zelle verbunden sind. Meistens ist es verhältnismäßig einfach, diese Partikel — im Gegensatz zu kompletten Zellen — für experimentelle Zwecke zu gewinnen.

Vorgänge des Energiestoffwechels, des Mineral- und Wasserhaushaltes können an Mitochondrien untersucht werden. Die Biochemie begann sich für diese Zellorganellen zu interessieren, nachdem Hogeboom, Pallade und Schneider [52], fußend auf älteren Arbeiten von Claude [53], gezeigt hatten, daß sich Zell-

mitochondrien durch Homogenisieren der Gewebe und anschließendes fraktioniertes Zentrifugieren als homogene Suspension gewinnen lassen. Bei der Untersuchung dieser Fraktion stellte sich heraus, daß die Mitochondrien die wichtigsten aeroben Stoffwechselzentren der Zelle sind. Zu den dort ablaufenden Prozessen gehören — um nur einige bedeutende zu nennen — der oxydative Abbau der Brenztraubensäure über den Zitronensäurezyklus und die Oxydation der Fettsäuren. Durch den Vorgang der oxydativen Phosphorylierung verwandeln die Mitochondrien die Oxydationsenergie in „phosphate bond-energy" (ATP), die eine direkt verwertbare Energieform für die meisten endergonischen Prozesse der gesamten Zelle darstellt. — Die Mitochondrien besitzen auch eine sekretorische Aktivität, die besonders für den Mineral- und Wasserhaushalt der Organellen von Bedeutung ist. Zwischen dem Inneren der Partikel und dem umgebenden Milieu besteht ein gelenkter Wasser- und Kationentransport. Dabei können gegen ein Konzentrationsgefälle Kalium und Natrium angereichert oder ausgeschieden werden. Im begrenzten Umfange können auch Wasserverschiebungen kompensiert werden, wenn das umgebende Milieu der Mitochondrien anisotonisch wird. Zwischen den sekretorischen Eigenschaften und dem Energiestoffwechsel besteht eine enge Beziehung. — Die sekretorische Aktivität der Mitochondrien ähnelt dem Verhalten der Zelle, das mag darin begründet sein, daß diese Partikel ebenfalls eine gut differenzierbare Grenzfläche besitzen. Die Existenz solcher Strukturen läßt sich funktionell und auch elektronenmikroskopisch nachweisen.

Untersuchungen an Mitochondrien haben Wert als Modellstudien für Zelleistungen und daneben auch zur Prüfung von Zellfunktionen, die ausschließlich — wie die oxydative Phosphorylierung — mit den Mitochondrien verkoppelt sind.

In den eigenen Untersuchungen wurde das Ziel verfolgt, den Einfluß des antidiuretischen Hormons auf den Wasserhaushalt von Mitochondrien zu untersuchen. Als Versuchspräparate dienten dabei isolierte Nierenmitochondrien, deren Stoffwechsel durch geeignete anisotonische Suspensionslösungen belastet wurde. In hypotonischen Saccharose-Lösungen kann eine Wasseraufnahme (Schwellung) der Partikel mit Kalium-, Natrium- und ATP-Abgabe an die Suspensionsflüssigkeit beobachtet werden. Die enge Beziehung des V zum osmotischen Druck ließ diese belasteten Mitochondrien als besonders geeignete Versuchsanordnung erscheinen, zumal wenn man bedenkt, daß bei der Konzentrierung des Harns im distalen Nephron mit einem erheblichen osmotischen Gradienten zwischen Tubuluslumen

und Nierenzellen gerechnet werden muß. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die Messung der Mitochondrienschwellung. Die Versuchsanordnung konnte so gewählt werden, daß fördernde und hemmende Einflüsse des Hormons auf die Wasseraufnahme erkannt werden konnten. Die Bestimmung des Kalium- und Natrium-Gehaltes in den Organellen sollte Hinweise für eine selektive Veränderung der Mitochondrienstruktur vermitteln. Schließlich wurde die Beteiligung des Energiestoffwechsels durch die Messung des ATP-Gehaltes in den Mitochondrien und die Abgabe an die Suspensionsflüssigkeit zu erfassen versucht.

Wenn der Wert dieser Mitochondrienversuche für die Verhältnisse in vivo beurteilt werden soll, dann sind Kenntnisse über den Hormongehalt in der Niere und in den Gewebsfraktionen unerläßlich. Darüber sind bisher wenig aufschlußreiche Experimente ausgeführt worden. Über die Verteilung im Nierengewebe fehlen überhaupt Angaben. Es war deshalb notwendig, die Aufnahme des Hormons durch die Niere und den Gehalt in den Zellfraktionen in einer vorausgehenden Studie zu untersuchen. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei der Bestimmung des antidiuretischen Hormons im biologischen Untersuchungsgut gewidmet, zumal die vielen Fehlermöglichkeiten, die dabei auftreten können, zum Teil Anlaß für die lückenhaften Kenntnisse über das Verhalten des V in der Niere sind. Für diese Untersuchungen wurde eine Methode zur V-Bestimmung im Antidiureseversuch an Ratten ausgearbeitet, die den besonderen Versuchsbedingungen angepaßt ist.

Methodik

A. Biologische Bestimmung des antidiuretischen Hormons

Chemische Nachweisverfahren eignen sich für die Bestimmung des antidiuretischen Hormons wegen der äußerst geringen Gewebskonzentration nicht. Bei den üblichen biologischen Verfahren hat sich die antidiuretische Wirkung des Hormons als Testgröße am empfindlichsten erwiesen. Die besten Testobjekte hierfür sind dressierte Hunde oder Hunde mit experimentellem Diabetes insipidus, die sich jedoch für Reihenuntersuchungen schlecht eignen, da sie in ausreichender Zahl nur sehr selten zur Verfügung stehen dürften. Dafür werden heute am häufigsten Ratte, Maus, Kaninchen und Kröte benutzt. Viele Bestimmungsmethoden wurden in den vergangenen 30 Jahren ausgearbeitet (Tabelle 1). Von keiner Methode kann allerdings gesagt werden, daß sie ein allgemein geeignetes und befriedigendes Verfahren wäre. Die Mängel lassen sich in folgenden Punkten zusammenfassen:

1. Die Streuung der Einzelergebnisse ist außerordentlich groß. Die Ursache liegt darin, daß äußere Störungen, die Einfluß auf die Diurese haben, sehr schwer von den Versuchstieren ferngehalten werden können. Naturgemäß müssen die Ergebnisse leicht durch endogenes V oder andere antidiuretische Faktoren verfälscht werden. So können unlustbetonte Reize („emotional stress") [54, 55], wie z. B. Schmerzen, eine Diuresehemmung hervorrufen. Die

Tabelle 1

Methoden zur Bestimmung der antidiuretischen Aktivität

Autor	Versuchstier	Applikationsweg	Empfindlichkeit (E), experimentelle Bedingungen
Gibbs (1930) [61]	Maus	s. c.	Keine Narkose, E: Nicht angegeben.
Burn (1931) [62]	Ratte	s. c.	Keine Narkose, E: 2 mE./100 g.
Theobald (1934) [63]	Hund	i. v.	Keine Narkose, E: 0,25 mE./Tier.
Gilman und Goodman (1937) [64]	Ratte	s. c.	Keine Narkose, E: 5 mE./Tier.
Walker (1939) [65]	Kaninchen	i. v.	Narkose, E: 0,5 mE./Tier.
Robinson und Farr (1940) [66]	Ratte	i. p.	Keine Narkose, E: Nicht angegeben.
Hickey, Hare und Hare (1941) [67]	Hund	i. v.	Diabetes insipidus, E: 0,4 mE./Tier.
Anselmino, Hoffmann und Kennedy (1932) [68]	Ratte	s. c.	Keine Narkose. E: Keine genaue Angabe.
Ham und Landis (1942) [69]; Ham (1943) [70]	Ratte	i. p.	Keine Narkose, E: 0,1 mE./100 g.
Jeffers, Livezey und Austin (1942) [58]	Ratte	i. v.	Narkose, Dauerkanüle, katheterisiert, E: 0,02 mE. pro Tier, $\lambda = 0{,}249$.
Hare, Melville, Chambers und Hare (1943) [71]	Hund	i. v.	Diabetes insipidus, E: 0,2 mE./Tier.
Fugo und Aragon (1947) [72]	Kaninchen	i. v.	Narkose, E: 0,2 mE./Tier.
Lindquist und Rowe (1949) [73]	Kaninchen	i. v.	Narkose, E: 0,2 mE./Tier.
Ralli, Raisz, Leslie, Dumm und Laken (1950) [50]	Ratte	i. p.	Keine Narkose, E: 0,2 mE./100 g.
Birnie, Jenkins, Eversole und Gaunt (1950) [74]	Ratte	i. p.	Keine Narkose, E: Nicht angegeben.
Ames, Moore und Van Dyke (1950) [75]	Hund	i. v.	Keine Narkose, mit und ohne Diabetes insipidus, E: 0,25 mE./Tier.
Leaf und Mamby (1952) [76]	Ratte	i. p.	Hypophysektomiert, E: Nicht angegeben.
Ginsburg (1951) [77]	Ratte	s. c.	Keine Narkose, E: 0,4 mE./100 g.
Heller und Blackmore (1952) [60]	Maus	i. v.	Keine Narkose, E: 0,01 mE./10 g.
Stein, Jinks und Mirsky (1952) [78]	Ratte	i. p.	Keine Narkose, E: 0,1 mE. pro Tier, $\lambda = 0{,}329$.

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Autor	Versuchstier	Applikationsweg	Empfindlichkeit (E), experimentelle Bedingungen
Ginsburg und Heller (1952) [79]	Ratte	i. v.	Keine Narkose, katheterisiert, Dauerkanüle, E: 0,01 mE./100 g.
Dicker (1953) [80]	Ratte	i. v.	Narkose, E: 0,004 mE./100 g.
Giere (1957) [81]	Ratte	i. v.	Narkose, katheterisiert, Dauerkanüle, E: 0,01 mE./100 g.
Buchborn [82]	Kröte	—	E: 0,01 mE., $\lambda = 0{,}228$.
Dieser Bericht	Ratte	i. a.	Keine Narkose, Dauerkatheter in Aorta und Ureteren, E: 0,01 mE./100 g.

meisten Methoden bieten dafür reichlich Gelegenheit durch subkutane oder intraperitoneale Injektion des Untersuchungsgutes, lästige Magensonden zur Wässerung der Tiere oder wechselnde Narkosetiefe während des Versuches. Schreiber [56] konnte eine Antidiurese bereits nach heftigen Bewegungen der Tiere beobachten. Obgleich einige Autoren eine reizlose intravenöse Injektion der Testlösung eingeführt oder Methoden für die Hemmung der Ausschüttung von endogenem V angegeben haben [57, 58], sind damit nach Ralli [59]; Heller und Blackmore [60] die Ergebnisse nicht entscheidend verbessert worden.

2. Die Diuresehemmung ist fernerhin unspezifisch. Auch andere Stoffe, die im biologischen Material vorkommen und von denen die wichtigsten Adrenalin, Arterenol, Histamin, Serotonin, Adenylsäurederivate, Renin und Ferritin sind, können die Wasserausscheidung vermindern.

3. Kleinste V-Mengen sind nur mit unverhältnismäßig großem Aufwand zu erfassen. Dadurch wird die Anwendung dieser Methoden für die Reihenbestimmungen erschwert.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden diese Mängel durch zwei Maßnahmen zu vermindern versucht:

Die Antidiurese wurde an Ratten gemessen, die operativ so vorbereitet waren, daß die Bestimmung praktisch unbemerkt vorgenommen werden konnte. Dazu erhielten die Tiere in einer vorausgehenden Operation Polyäthylenkatheter in die Aorta — vor den Abgang der Nierenarterien — und in beide Ureteren gelegt. Die Katheter wurden im Nacken aus dem Körper geführt. Sie wurden meist reizlos vertragen. Ein weiterer Vorteil dieser operativen Vorbereitung war die lange Verwendbarkeit der Ratten. Über Wochen — in einzelnen Fällen über Monate — war die V-Bestimmung mit geringem Aufwand an Zeit und Material an Tieren möglich, deren Reaktionsfähigkeit gegen das Hormon bekannt war.

Das an diesen Tieren zur Untersuchung kommende biologische Material wurde in jedem Fall — bei Harn, Gewebe und Durchströmungsflüssigkeit — von störenden Verbindungen weitgehend gereinigt. Damit sollte die Spezifität der biologischen Bestimmung verbessert werden. Als Reinigungsverfahren benutzten wir eine von Bisset und Walker [86] beschriebene Methode, die in einigen Abschnitten modifiziert wurde, um die V-Verluste zu verringern.

Operative Vorbereitung der Ratten

Einlegen eines Aortenkatheters: Diese Methode ähnelt einem Verfahren, das Still [83] angegeben hat. Unter Äthernarkose wird das Abdomen eröffnet und die Aorta zwischen den beiden Nierenarterien und der Bifurkation frei-

gelegt. Das Peritoneum wird vorsichtig in der Höhe der Nieren (für die temporäre Unterbindung der Aorta) und an der Bifurkation eröffnet. Für die Unterbindung eignet sich ein dicker Wollfaden, der die Aorta gegen einen weichen Gummischlauch zieht. Jede Quetschung der Aortenwand sollte vermieden werden. Es erwies sich günstig, in die Unterbindung die Vena cava und die Muskulatur aus der Nachbarschaft einzubeziehen. Mit einer Injektionskanüle (Nirosta Nr. 15) wird an der Bifurkation die Aortenwand durchstochen und in diese Öffnung, nachdem die Kanüle entfernt ist, ein abgeschrägter Polyäthylenschlauch eingeführt (Clay-Adams Co., New York, Nr. 10, mit 0,28 mm

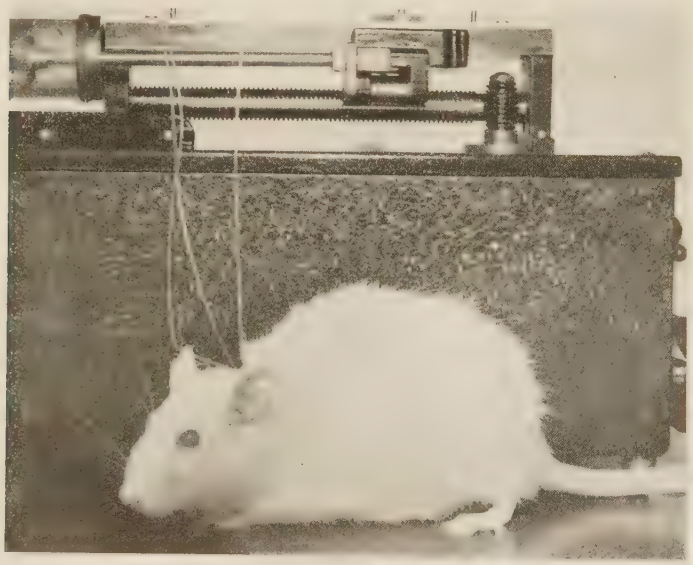


Abb. 2.
Für den Antidiureseversuch operativ vorbereitete Ratte. Im Nacken treten zwei Ureteren- und ein Aortenkatheter aus dem Körper.

Innen- und 0,61 mm Außendurchmesser, Gesamtlänge 40—50 cm, der Schlauch ist mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt und an der äußeren Öffnung mit einer Stecknadel verschlossen). Der Schlauch soll soweit in die Aorta eingeschoben werden, bis die Schlauchmündung etwa 3 mm oberhalb der Abgänge der Nierenarterien liegt. Die Lage des Katheters kann mit einer stumpfen Pinzette verfolgt werden. In der benachbarten Muskulatur wird der Katheter mit einer Naht fixiert und dann im weiten Bogen zur seitlichen Bauchwand geführt. Nach erneuter Befestigung wird der Schlauch unter der Haut bis zum Nacken und nach außen geleitet. Die Führung unter der Haut gelingt mit einer langen weiten Kanüle. Bei seltener Benutzung des Katheters zur Injektion empfiehlt sich die Füllung mit einer Heparinlösung.

Einlegen der Ureterenkatheter: Im Anschluß an die Aortenkatheterisierung werden die Ureteren beiderseits etwa 2—3 cm unterhalb der Nieren freigelegt, vom Bindegewebe schonend befreit und durchschnitten. In die renale Öffnung wird auf beiden Seiten ein Polyäthylenschlauch (0,8 mm Außen- und etwa 0,5 mm Innendurchmesser, Gesamtlänge 50—60 cm, der Schlauch ist mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt und während der Operation am äußeren Ende verschlossen) etwa 0,5 cm eingeführt. Die Katheter werden in die Ureteren eingebunden und mehrfach an der dorsalen Bauchwand befestigt. Zwischen dem Katheterende und dem Nierenhilus sollen etwa 1,5 cm frei bleiben, damit sich eine normale Peristaltik ausbilden kann. Zusammen mit dem Aortenkatheter

gelangen beide Schläuche aus dem Körper. Die freien Enden der Katheter werden von einem 15 cm langen, dickwandigen Polyäthylenschlauch geschützt, der mit Lederschlaufen von den vorderen Extremitäten der Ratte gehalten wird. Der wenige Gramm schwere Schutzschlauch beeinträchtigt die Tiere nach kurzer Gewöhnungszeit nicht mehr.

Am Operationstag und dem folgenden Tage erweist sich ein Wasserstoß für die Nierenfunktion günstig. Die Tiere erhielten 8 ml 0,5%ige Kochsalzlösung pro 100 g Körpergewicht in 10—20 Minuten infundiert.

In seltenen Fällen kann nach der Operation im Harn Eiweiß nachgewiesen werden unter zunehmender Verschlechterung des Befindens der Tiere. Ursache ist meistens, daß ein Ureterenkatheter bis an den Nierenhilus geführt wurde und mechanische Schäden setzt, die zu einer partiellen Verlegung der ableitenden Harnwege führen können. Nach unseren Erfahrungen sind etwa 25% der Ratten durch Schäden während oder nach der Operation oder durch sehr geringe Empfindlichkeit gegen V für Reihenversuche unbrauchbar oder schlecht geeignet. Abb. 2 zeigt eine Ratte mit einem Aorten- und zwei Ureterenkathetern.

Tierhaltung

Die Ratten wurden in runden Käfigen gehalten. Durch den Deckel ragten die drei Katheter mit dem Schutzschlauch frei beweglich heraus. Der Durchmesser der Käfige betrug etwa 25 cm. Die freien Enden der Ureterenkatheter dürfen nicht verstopfen (durch eintrocknenden Harn) und müssen unterhalb der Lauffläche der Ratte fixiert sein, damit die Entleerung der ableitenden Harnwege nicht erschwert ist. Dazu werden die freien Katheterenden 10 cm unterhalb der Lauffläche in einen Wasserschlauch geleitet, durch den ständig etwas Wasser fließt.

Es wurden männliche Wistarratten mit einem Körpergewicht von 200 bis 250 g verwendet. Die Tiere erhielten an versuchsfreien Tagen unbegrenzt Wasser und ein Mischfutter aus Weizen, Hafer, Garnelen und Sonnenblumenkernen. Milch wurde mehrfach wöchentlich verabreicht. Das feste Futter wurde auch an den Versuchstagen nicht abgesetzt.

Frühestens 48 Stunden nach der Operation wurde mit den Versuchen begonnen. Zwischen den Versuchsreihen, die etwa sechs Stunden beanspruchten, waren zwei Ruhetage eingeschoben.

Bestimmung der Antidiurese

Während der V-Bestimmung bleiben die Tiere in ihren runden Wohnkäfigen. Anordnung und Länge der Katheter, die aus dem Käfig herausstehen, müssen alle Handhabungen unbemerkt zulassen. Selbst Injektionen und Infusionen beunruhigen die Tiere nicht, wenn die Lösungen auf 37° C temperiert sind.

Die Ureterenkatheter werden zur Bestimmung des Harnvolumens in einem Glasröhrchen fixiert, das 10 cm unter der Lauffläche der Tiere angebracht ist. Die Harntropfen werden gezählt und fortlaufend registriert.

Zu Beginn der Versuchsreihe werden die Ratten zweimal — im Abstand von 40 Minuten — mit 5% ihres Körpergewichtes 0,2%iger Kochsalzlösung gewässert. Die Flüssigkeit wird durch den Aortenkatheter in 10—15 Minuten infundiert. 20 Minuten nach der zweiten Infusion beginnt die Testung. Jede Bestimmung besteht aus der Kontrollperiode (10 Minuten = B_1) und der Meßperiode (20 Minuten = B_2). Ein annähernd gleichmäßiger Hydratationsgrad der Tiere wird erreicht, wenn vor jeder Kontrollperiode die Harnmenge des vorausgegangenen Versuches durch 0.2%ige Kochsalzlösung ersetzt wird. In der Kontrollperiode wird die Normalausscheidung bestimmt. Die Schwankungsbreite in einer Versuchsreihe ist recht gering, meistens unter 10%. Störungen können sich durch Freßperioden oder temporäre Unruhe einstellen. In diesen Fällen wurden die Versuche vorübergehend unterbrochen. Zu Beginn der Meßperiode wird die Test- und Vergleichslösung (0,5 ml, 37° C) innerhalb einer Minute möglichst gleichmäßig in die Aorta injiziert.

Für die Berechnung der antidiuretischen Wirksamkeit von Test- und Vergleichslösungen wurde als einfacher Parameter die relative Diuresehemmung — prozentual gegenüber der Diuresegröße in der Kontrollperiode — $\left[\left(\frac{2\,B_1 - B_2}{2\,B_1}\right) 100\right]$ benutzt. Die Verwendung dieses Wirkungsquotienten ergab eine gesetzmäßige Abhängigkeit von der applizierten V-Dosis. Erfaßt man diese Beziehung für Einzelergebnisse, die an mehreren Tagen (maximal 20 Tagen) von einem Tier gewonnen wurden, dann erhält man eine s-förmige log-Dosis-Wirkungskurve (Abb. 3). Diese läßt sich in eine lineare Regressionslinie umformen, wenn man das Hazensche Verfahren zur Wertbemessung biologischer Substanzen benutzt (Abb. 4), das nicht nur für Wirkungsprozentsatz-

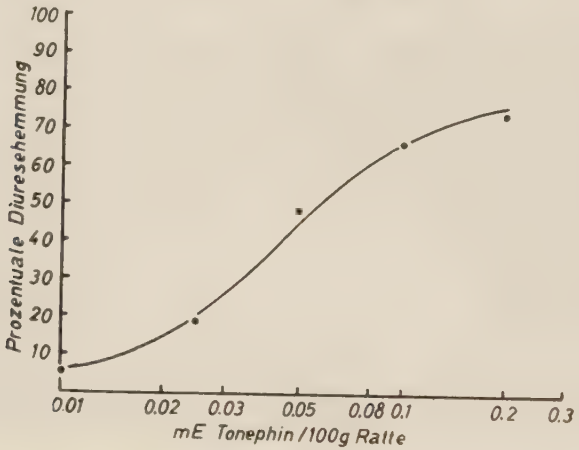


Abb. 3.
log-Dosis-Wirkungskurve für die Diuresehemmung durch Tonephin an einer Ratte (Versuchsreihe 1 in Tabelle 2).

quoten, sondern auch für die Relation zwischen Dosis und quantitativ faßbarer Wirkung anwendbar ist und im Prinzip der sogenannten Probit-Transformation entspricht.

Nach der Methode von Prigge und Schäfer[84] wurde die Regressionskurve entsprechend der Gleichung $y = R(x - \bar{x}) + \bar{y}$ berechnet, indem zunächst die Gewichte $\bar{x}$ und $\bar{y}$ bestimmt wurden: $\bar{x} = \frac{\Sigma g\,x}{\Sigma g}$, $\bar{y} = \frac{\Sigma g\,y}{\Sigma g}$

x ist der Logarithmus der Dosis, g das Gewicht der Einzelbeobachtung (aus einer graphischen Darstellung bei Prigge und Schäfer[84]), das mit jedem Wert von x und y zu mutiplizieren ist; y ist der dem Hazenschen Ordinatenwert P' des Wirkungsindex entsprechende Probitwert, der aus einer Tabelle über „Fläche und Ordinaten der Normalverteilungskurve" entnommen wurde. Aus den gewogenen Mittelwerten $\bar{x}$ und $\bar{y}$ ergibt sich der Richtungskoeffizient R der Regresssionslinie $R = \frac{\Sigma g\,y\,(x - \bar{x})}{\Sigma g\,(x - \bar{x})^2}$.

Das Ergebnis für drei Wirkungsgeraden ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Die Fehlerrechnung ist ebenfalls in Tabelle 2 zusammengefaßt. Die Streuung der Einzelwerte (σ) um die Regressionslinie errechnet sich nach dem M_k-Verfahren von Prigge[85] aus der Fehlerformel

$$P' \pm M = \frac{2nP' + 1 \pm \sqrt{4nP'(1 - P') + 1}}{2(n + 1)}$$

(n = Gesamtzahl der Tiere für die Wirkungsgerade, P' = Hazen scher Ordinatenwert für y, M = Fehlerbereich). Zu den M-Werten wird aus der Tabelle über „Fläche und Ordinaten der Normalverteilungskurve" der y-Wert aufgesucht. Die halbe Differenz der beiden y-Werte ist σ_y. Die Ergebnisse dieser Berechnung sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Für die Genauigkeit der Bestimmungsmethode ist die mittlere logarithmische Abweichung der Dosis λ, der sogenannte Präzisionsindex, ein Maßstab. λ ist der Quotient $\frac{\sigma_y}{R}$. Damit besitzt

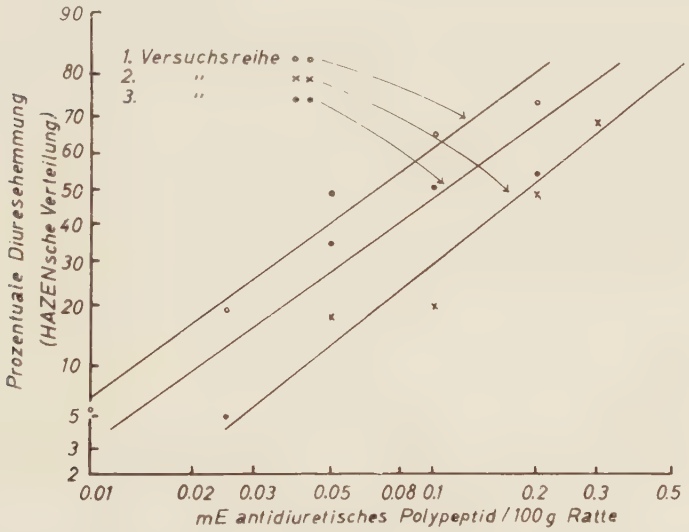


Abb. 4.
Wirkungsgeraden der Diuresehemmung von drei Versuchsreihen (vgl. Tabelle 2).

das Verfahren eine gute Genauigkeit, wenn die Resultate — auch von mehreren Versuchstagen — auf die jeweilige Testratte bezogen werden (Prinzip der gleichen Versuchsanordnung). Zum Vergleich sind die λ-Werte anderer Verfahren — soweit sie bekannt sind — in Tabelle 1 angeführt.

In Abb. 4 konnte gezeigt werden, daß die Ergebnisse bei der Bestimmung antidiuretischer Stoffe an einer Ratte ungefähr auf einer Geraden liegen. Werden mehrere Ratten verwendet, dann können sich die Wirkungsgeraden mehr oder weniger parallel verschieben. Anlaß dafür sind die individuellen Unterschiede der Tiere, z. B. das Alter.

Die Voraussetzung für reproduzierbare Testergebnisse an einer Ratte sind eine gleiche äußere Versuchsanordnung und ein stabiler V-Standard, zu dem das Untersuchungsgut in Beziehung gesetzt werden kann. Darin stimmt dieses Verfahren mit den biologischen Bestimmungsmethoden überein, in denen durch direkten Vergleich am selben Gewebe gemessen wird, z. B. bei der Acetylcholin-Bestimmung am Rückenmuskel des Blutegels.

Die Abb. 4 vermittelt einen Eindruck von der Empfindlichkeit dieses Verfahrens. 10—40 μE. V pro 100 g Ratte können bei den meisten Tieren noch nachgewiesen werden. Diese Methode ist damit ebenso empfindlich wie die besten bekannten Verfahren (Tabelle 1).

Praktisch werden die Bestimmungen so ausgeführt, daß die unbekannte Lösung mit antidiuretischer Aktivität als Doppel- oder Dreifachbestimmung mit

Tabelle 2

1. Versuchsreihe (Ratte 1), Tonephin

Dosis µE. 100 g	x	n	P′	y	g	gx	gy	x — x̄	g y (x — x̄)	(x — x̄)²	g (x — x̄)²
10	1,000	10	0,055	— 1,60	2,5	2,50	— 4,00	— 0,77	3,400	0,59	1,48
25	1,398	10	0,190	— 0,88	5,0	6,94	— 4,40	— 0,372	1,630	0,14	0,70
50	1,699	10	0,480	— 0,05	6,5	11,04	— 0,32	— 0,071	0,028	0,01	0,07
100	2,000	10	0,660	+ 0,41	6,0	12,00	+ 2,46	+ 0,230	0,580	0,05	0,30
200	2,301	10	0,740	+ 0,64	5,5	12,64	+ 3,52	+ 0,531	1,870	0,28	1,54
		50			25,5	45,12	— 2,74		7,508		4,09

$$\bar{x} = \frac{\Sigma gx}{\Sigma g} = \frac{45{,}12}{25{,}5} = 1{,}77;\ \text{Num}\ (\bar{x}) = 59\ \mu\text{E}$$

$$\bar{y} = \frac{\Sigma gy}{\Sigma g} = \frac{2{,}74}{25{,}5} = -0{,}107;\ P' = 0{,}458$$

$$R = \frac{\Sigma g\, y\, (x - \bar{x})}{\Sigma g\, (x - \bar{x})^2} = \frac{7{,}508}{4{,}09} = 1{,}84$$

$y = -1{,}517$
$(x = 1{,}0)$
$P' = 0{,}065$
$y = +0{,}327$
$(x = 2{,}0)$
$P' = 0{,}628$

Tabelle 2 (Fortsetzung)

2. Versuchsreihe (Ratte 2), Oxypressin

Dosis µE./100 g	x	n	P′	y	g	gx	gy	x — x̄	g y (x — x̄)	(x — x̄)²	g (x — x̄)²
50	1,699	10	0,17	— 0,96	4,8	8,15	— 4,61	— 0,451	+ 2,08	0,203	0,97
100	2,000	10	0,20	— 0,84	5,0	10,00	— 4,20	— 0,150	+ 0,63	0,023	0,12
200	2,301	10	0,49	— 0,03	6,5	14,95	— 0,19	+ 0,151	— 0,03	0,023	0,15
300	2,477	10	0,69	+ 0,50	6,0	14,80	+ 3,00	+ 0,327	+ 0,98	0,107	0,64
		40			22,3	47,90	— 6,00		+ 3,66		1,68

$\bar{x} = 2{,}15$; Num $(\bar{x}) = 143\ \mu$E
$\bar{y} = -0{,}270$; $P' = 0{,}394$
$R = 1{,}95$
$y = -1{,}14$; $P' = 0{,}127$
$(x = 1{,}699)$
$y = +0{,}40$; $P' = 0{,}655$
$(x = 2{,}477)$

Tabelle 2 (Fortsetzung)

3. Versuchsreihe (Ratte 3), Tonephin

Dosis µE./100 g	x	n	P′	y	g	gx	gy	$x - \bar{x}$	$g y (x - \bar{x})$	$(x - \bar{x})^2$	$g (x - \bar{x})^2$
25	1,398	4	0,05	1,650	1,0	1,398	−1,650	−0,502	0,83	0,25	0.25
50	1,699	5	0,35	−0,385	2,5	4,170	−0,960	−0,201	0,19	0,04	0,10
100	2,000	8	0,51	+0,025	5,0	10,000	+0,125	+0,100	0,01	0,01	0,05
200	2,301	2	0,55	+0,130	1,3	2,990	+0,169	+0,401	0,07	0,16	0,21
		19			9,8	18,558	−2,316		1,10		0,61

$\bar{x} = 1{,}9$; Num $(\bar{x}) = 79{,}5\ \mu E$
$\bar{y} = -0{,}236$; $P' = 0{,}407$
$R = 1{,}80$
$y = -1{,}136$
$(x = 1{,}398)$
$P' = 0{,}128$
$y = 0{,}494$
$(x = 2{,}301)$
$P' = 0{,}689$

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Tier-Nr.	Richtungskoeffizient	Mittlere Abweichung der Wirkungsgeraden σ_y	Präzisionsindex $\lambda = \frac{\sigma_y}{R}$
1	1,84	0,201	0,109
2	1,95	0,166	0,085
3	1,80	0,260	0,144
Durchschnittswerte	1,86	0,209	0,113

bekannten, etwa gleich starken V-Standardkonzentrationen verglichen wird. Bei der nachträglichen graphischen Darstellung auf Wahrscheinlichkeitspapier (Schleicher & Schüll, Nr. 279 1/2) können die Ergebnisse auf der Standardwirkungsgeraden kontrolliert werden.

Bestimmung antidiuretischer Stoffe nach Stein, Jinks und Mirsky [78]

Ein Teil der Bestimmungen antidiuretischer Polypeptide wurde zu Beginn dieser Untersuchungen mit dem Verfahren von Stein, Jinks und Mirsky[78] ausgeführt. Dabei werden Ratten als Testtiere verwendet. Das Untersuchungsgut wird intraperitoneal injiziert (vgl. auch Tabelle 1).

Extraktion von antidiuretischen Polypeptiden aus Gewebe, Durchströmungsflüssigkeit und Harn mit saurem Alkohol (Mod. nach Bisset und Walker [86])

Das Untersuchungsgut wurde mit neun Volumen 80%igem Äthylalkohol, der auf etwa —10° C vorgekühlt war, gemischt und mit 2 n H_2SO_4 angesäuert (Indikator: Kongorot). Das Gewebe wurde mit Eiskühlung nach Potter und

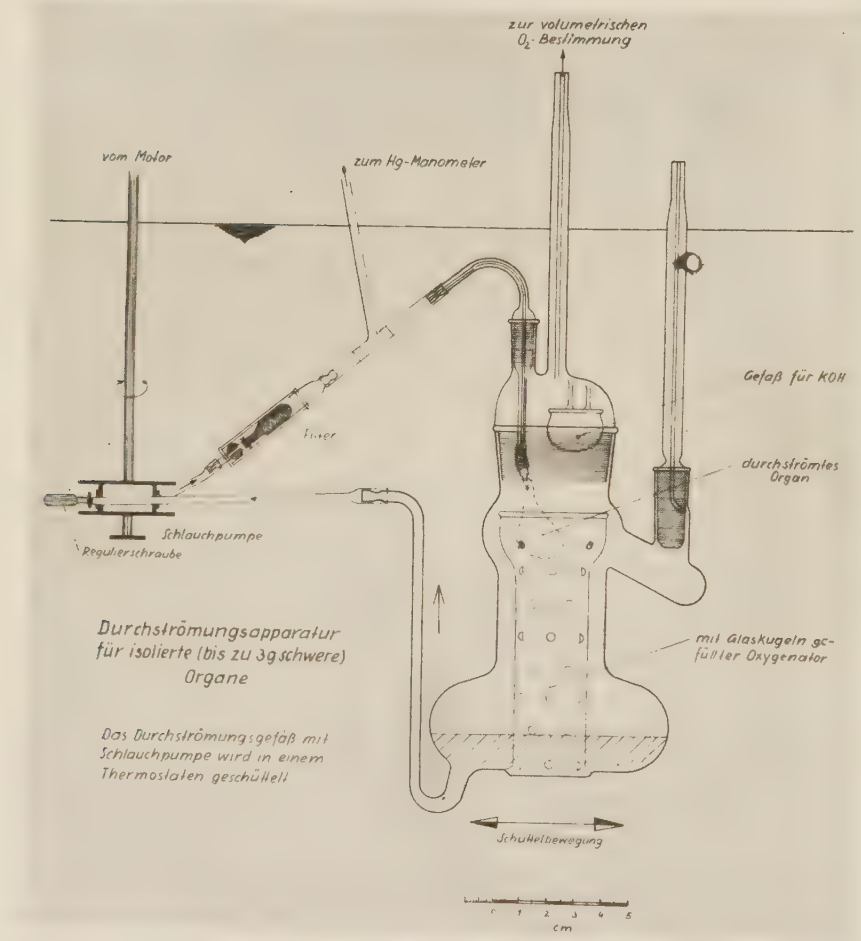


Abb. 5

Elvehjem homogenisiert. Zwischen der Entnahme des Untersuchungsgutes und der Abkühlung auf Temperaturen unter 0° C lagen nur wenige Sekunden (maximal 20 Sekunden). Die Mischung wurde hochtourig abzentrifugiert und lyophilisiert. Daraufhin wurde das Trockengut in zwei Volumen Wasser aufgenommen, abzentrifugiert und 20 Minuten gegen fließendes Wasser dialysiert. Vor der Hormonbestimmung wurde die Flüssigkeit mit $NaHCO_3$ neutralisiert. Flammenphotometrische Kontrollen des Kaliumgehaltes ergaben Mengen unter 0,5 mg/ml Dialysat. Mit diesem Extraktionsverfahren konnten aus Nierengewebe

im Mittel 87% von zugesetzem O wiedergefunden werden ($n = 8$, $\sigma = 12\%$, $c = 0{,}1$—3 mE./g Nierengewebe [Frischgewicht]) — vorausgesetzt die Bestimmung wurde sofort nach der Beimischung zum wässerigen Organbrei vorgenommen.

B. Durchströmung der Meerschweinchenniere

Die Durchströmungsversuche wurden in einer von Heim, Leuschner und Wunderlich[87] angegebenen Apparatur ausgeführt. Die Versuchsanordnung zeigt Abb. 5. In der Mitte des Glasgefäßes ist ein Oxygenatorturm eingeschmolzen, der für eine ausreichende O_2-Sättigung der Durchströmungsflüssigkeit sorgt. Auf dem Turm liegt eine perforierte Kunststoffplatte, die das durchströmte Organ trägt. Die Arteria renalis ist mit einem Polyäthylenkatheter an die Schlauchpumpe angeschlossen, die Vena renalis läßt die Durchströmungsflüssigkeit in den Oxygenatorturm abfließen. Der Turm ist teilweise mit Glaskugeln beschickt, bietet jedoch noch Raum zur Aufnahme der künstlichen Harnblase: einem dünnwandigen, verschlossenen Gummibeutel (Fassungsvermögen etwa 15—20 ml), der mit einem Katheter Verbindung zum Ureter hat. Die Harnentnahme ist durch einen zweiten Katheter möglich. Die Schlauchpumpe treibt aus dem unteren Teil des Durchströmungsgefäßes Flüssigkeit mit einem Druck von 75 ± 5 mm Hg in die Arteria renalis. Die Apparatur kann wechselweise zur Messung des O_2-Verbrauches oder zur Entnahme von Harn und Durchströmungsflüssigkeit für analytische Zwecke verwendet werden. Im zweiten Fall enthält die Anschlußöffnung zur O_2-Bestimmung Kanülen zur Entnahme von Harn und Durchströmungsflüssigkeit. Bei der O_2-Bestimmung wird CO_2 in einem Kalilaugengefäß im Deckel der Glasapparatur gebunden. Glasgefäß und Schlauchpumpe befinden sich zur Temperaturkonstanz in einem Wasserbad und werden zur besseren Sauerstoffsättigung der Durchströmungsflüssigkeit — in Analogie zur Warburgschen Versuchsanordnung — geschüttelt. Das Organ wird mit 12—15 ml Flüssigkeit durchströmt. Sie besteht je zur Hälfte aus Meerschweinchenblut und aus einer Elektrolytlösung (0,108 m NaCl, 0,012 m KCl, 0,006 m $CaCl_2$, 0,0005 m $MgCl_2$, 0,03 m K-Na-Phosphatpuffer, pH 7,4, als Atmungssubstrat diente Brenztraubensäure in einer Endkonzentration von 0,05 m). Diese Durchströmungsflüssigkeit wird „Halbblut" genannt. In einzelnen Fällen wurde für besondere Fragestellungen ausschließlich wässerige Durchströmungsflüssigkeit oder auch „Vollblut" verwendet.

Die Nieren wurden von 300—500 g schweren Meerschweinchen entnommen. Die Präparation fand in Urethan-Narkose statt. In der Regel wurden beide Nieren verwendet. Die Organe waren maximal fünf Minuten vom Blutstrom abgeklemmt. Die künstliche Blase wurde vor der Entnahme des Organs aus dem Meerschweinchen an den Ureter angeschlossen.

Der Atmungsquotient betrug im Mittel $Q_{O_2\,(\text{Niere})} = 24 \pm 4$ (σ), $n = 12$.

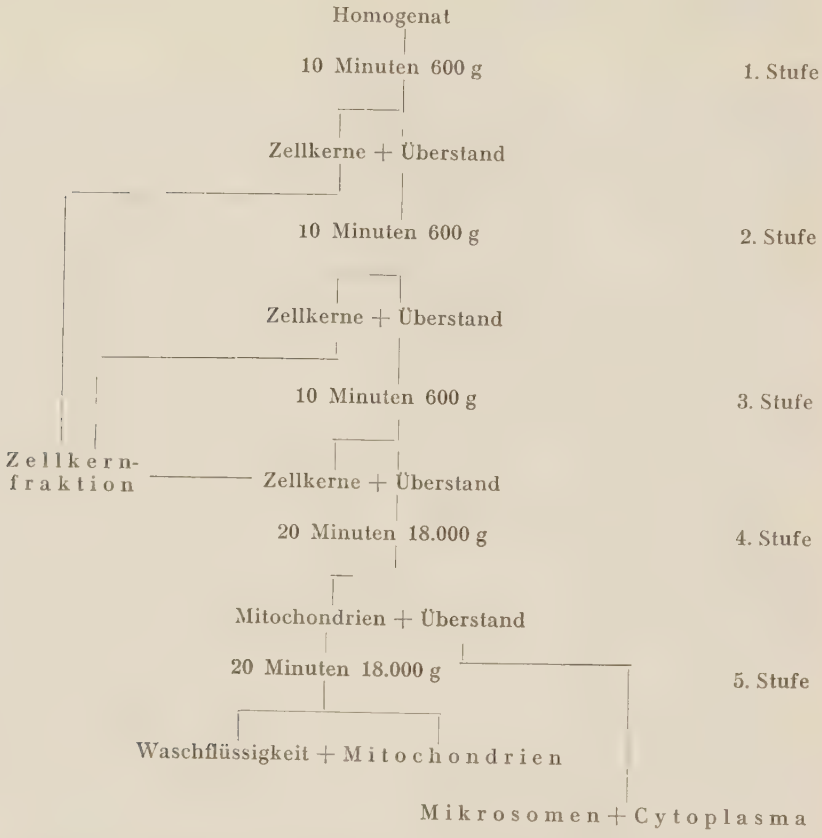
C. Fraktionierung des Nierenhomogenates in 0,44 m Rohrzuckerlösung zur Bestimmung antidiuretischer Polypeptide

Die Fraktionierung lehnt sich an die Methode von Schneider[88] an. Für jeden Versuch wurden zwei Meerschweinchennieren verwendet, die mit antidiuretischen Polypeptiden durchströmt worden waren. Die Organe wurden rasch aus der Durchströmungsapparatur entnommen, gewogen und in neun Volumen eiskalter 0,44 m Rohrzuckerlösung mit dem Gerät von Potter und Elvehjem homogenisiert. Daraufhin wurde das Homogenat zehn Minuten bei 600 g mit der Christ-Kühlzentrifuge abgeschleudert. Das Präzipitat wurde zweimal in 2,5 Volumen 0,44 m Rohrzuckerlösung rehomogenisiert, zentrifugiert und ergibt schließlich die Zellkernfraktionen.

Die vereinigten überstehenden Flüssigkeiten von der Zellkerngewinnung wurden zehn Minuten bei 18.000 g zur Gewinnung der Mitochondrien zentrifugiert. Durch Resuspendieren in 2,5 Volumen 0,44 m Rohrzuckerlösung und zehn Minuten Zentrifugieren bei 18.000 g wurden die Mitochondrien zweimal

gewaschen. Sie wurden in 0,44 m Rohrzuckerlösung aufgenommen. Die Suspension ist gelblich-bräunlich. Die überstehende Flüssigkeit enthält die Mikrosomen und das Cytoplasma.

Das Prinzip des eben beschriebenen Verfahrens wird nachfolgend wiedergegeben:



Alle Manipulationen wurden bei 0—3° C ausgeführt. Die Sedimente wurden im vorgekühlten Homogenisator nach Potter und Elvehjem resuspendiert. Die Fraktionen wurden im Phasenkontrastmikroskop geprüft. Für die N-Bestimmungen wurde ein titrimetrisches Kjeldahl-Verfahren verwendet. Der Eiweiß-N der Zellfraktionen wurde im Rückstand nach der Polypeptid-Extraktion mit saurem Alkohol ermittelt.

D. Gewinnung von Nierenmitochondrien für Stoffwechselversuche

Mitochondrien für diese Zwecke wurden aus Nierengewebe von Mäusen gewonnen. Die Präparation folgte dem Prinzip von Schneider[83]. Für diese Stoffwechselversuche war es notwendig, vitale Partikel mit langer Überlebenszeit zu erhalten. Dieses Ziel ließ sich am einfachsten durch Verkürzung der Präparationszeit erreichen. Deshalb wurde das Gewebe nur über die Stufen 1 und 4 (vgl. Methodik C) fraktioniert. Der Verlust an Mitochondrien und die Verunreinigung durch Cytoplasma ist verhältnismäßig geringfügig. Diese Zell-

fraktion soll als „ungewaschene Mitochondrienfraktion" bezeichnet werden. Auch bei dieser Zellfraktionierung wurde großer Wert auf Temperaturkonstanz (0—3° C) gelegt. Nach der Tötung der Tiere wurden die Gewebe sofort aufgearbeitet.

Die Mitochondrien aus 1 g Nierengewebe wurden in 1 ml 0,44 m Rohrzuckerlösung suspendiert. Dies ist die Stammsuspension der Mitochondrien (M). Diese Partikel erwiesen sich — phasenkontrastmikroskopisch untersucht — von variabler Größe (etwa 0,5—2 μ) und sphärischer Form. Der N-Gehalt der Stammsuspension betrug etwa 4 mg N pro Milliliter M.

E. Messung der Mitochondrienschwellung

Das Prinzip ist eine Trübungsmessung der Mitochondriensuspension. Bei einer Zunahme des Partikelvolumens wird das durchstrahlende Licht weniger gestreut. Der Extinktionswert der Suspension nimmt ab. Für reproduzierbare Werte sind konstante räumliche Verhältnisse (Abstand zwischen Küvette und Blende, Blendenwert usw.) entscheidend. Für die Abnahme der Extinktion mag außer der Volumenszunahme der Mitochondrien die Differenz der Brechungsindices von Mitochondrien und Suspensionslösungen von Bedeutung sein.

Die Stammsuspension M wurde für die Messung der optischen Dichte so verdünnt, daß die Extinktion $0{,}70 \pm 0{,}10$ (für intakte Mitochondrien) betrug. Als Vergleichslösung diente Wasser. Die Untersuchungen wurden mit einem Zeiß-Spektralphotometer (Schichtdicke 1 cm) bei 520 nm ausgeführt.

Versuchsanordnung: Die Stammsuspension M wurde 1 : 20 mit 0,44 m Rohrzuckerlösung versetzt (M_{20}) und bei 0° C aufbewahrt. Zum Versuch wurden 0,3 ml M_{20} in Küvetten pipettiert und zum Zeitpunkt 0 mit 2,7 ml der jeweiligen hypotonischen Versuchslösung aufgefüllt. In den Versuchen mit antidiuretischen Polypeptiden wurden die Mitochondrien mit diesen Substanzen vorinkubiert und erst zwei Minuten danach mit der hypotonischen Lösung versetzt. Die Endkonzentration der Mitochondrien ist etwa 1 : 200. In Abständen von zwei bis zehn Minuten wurde der Extinktionswert abgelesen. Durch gestaffelte Photometrie konnten sieben oder elf Ansätze gleichzeitig bearbeitet werden. Die Mitochondrien sind etwa eine Stunde lang nach der Präparation verwendbar.

Alle Versuche wurden bei Zimmertemperatur — etwa 20° C — vorgenommen. Da M_{20} bei 0° C aufbewahrt wurde, lag die Anfangstemperatur der Versuchsansätze 2—3° C unter Zimmertemperatur.

F. Bestimmung des Kalium- und Natrium-Gehaltes in Mitochondrien

Um ausreichende Mengen Mitochondrien für die Bestimmung dieser Komponenten zu erhalten, war es notwendig, den oben beschriebenen Versuchsansatz für die Volumenbestimmung zu ändern: 8 ml M wurden in einem Erlenmeyer-Kolben im Wasserbad bei 20° C mit den antidiuretischen Polypeptiden vorinkubiert und dann mit der jeweiligen Versuchslösung verdünnt. Zur Bestimmung wurden in kurzen Zeitabständen Flüssigkeitsmengen entnommen, die etwa 0,5—1 ml M entsprachen. Die parallele Messung des Mitochondrienvolumens erfolgte in der oben beschriebenen Weise: Zum jeweiligen Zeitpunkt wurden 0,1 ml Mitochondriensuspension mit einer Blutzuckerpipette aus dem Erlenmeyer-Kolben entnommen und bis zur Endkonzentration von 1 : 200 mit der jeweiligen hypotonischen Versuchslösung verdünnt.

Eine Schwierigkeit bei der Kationenbestimmung in Mitochondrien bestand darin, wie die Partikel in kürzester Zeit von der Suspensionslösung abgetrennt werden konnten, um unerwünschten Elektrolytverschiebungen zu entgehen. Mit der Zentrifuge Junior III mit Hochgeschwindigkeitsaufsatz der Firma Christ, Osterode, gelang es, in 100 Sekunden bei einer Beschleunigung von 20.000 g die Partikel aus 0,44 m Rohrzuckerlösung abzutrennen. Diese Fraktionierung erfolgte bei 20° C, nachdem seit Bartley und Davies[89] bekannt ist, daß Mitochondrien bei 0° C mehr Kationen an die Suspensionslösung abgeben als bei Zimmertemperatur, wenn der intakte Energiestoffwechsel den Gehalt

stabilisiert. Vom Zentrifugat wurde die klare überstehende Flüssigkeit sofort abgetrennt, das Präzipitat mit 0,5 ml 6%iger Trichloressigsäure versetzt und nach gründlicher Durchmischung abzentrifugiert. Die vollständige Extraktion von Kalium und Natrium wurde in einigen Fällen durch erneute Extraktion des Bodenkörpers mit konzentrierter HNO_3 überprüft.

Die Bestimmung von Kalium und Natrium wurde mit dem Zeiß-Spektralphotometer mit Flammenphotometerzusatz ausgeführt. Für die Messungen wurde eine Reihe von Eichlösungen mit abgestuften Elektrolytkonzentrationen, wie sie in der Arbeit von Mosher, Boyle, Bird, Jacobson, Batchelor, Iseri und Myers[90] angegeben worden sind, benutzt. Jede Probe wurde mit einer Standardlösung in mindestens vier Ablesungen verglichen. Die Dispersion für eine Einzelbestimmung betrug etwa ± 1%.

Tabelle 3

Wirkungsverhältnis von Vasopressin, Oxypressin * und Oxytocin (in Einheiten pro Milligramm)

	Antidiuretische (Hund)	Vasopressorische (Ratte)	Oxytocische (Rattenuterus)
	Wirkung		
Vasopressin	600	600	30
Oxypressin	18	3	20
Oxytocin	3	7	500

* Teils nach Mitteilung der Firma Sandoz A. G., Nürnberg, und teils nach Katsoyannis[92].

G. Bestimmung des ATP-Gehaltes in Mitochondrien

Bei der ATP-Bestimmung wurde ähnlich wie bei der Erfassung von Kalium und Natrium vorgegangen. Nach der kurzzeitigen Fraktionierung der Mitochondriensuspension in der Christ-Zentrifuge wurde das Präzipitat sofort in flüssigem O_2 eingefroren und mit 0,5 ml 4%iger Perchlorsäure versetzt. Daraufhin wurden die Proben einzeln auf Zimmertemperatur erwärmt, gewogen und nach gründlicher Durchmischung erneut abzentrifugiert. In dieser Lösung wurde ATP mit dem optischen Fermenttest nach Bücher[91] bestimmt, der aus der Hauptreaktion

D(—)-3-Phosphoglycerinsäure + ATP $\rightleftarrows$ D-1,3-Diphosphoglycerinsäure + ADP

und der Hilfsreaktion

D-1,3-Diphosphoglycerinsäure + DPN-H + H^+ $\rightleftarrows$ D(+)-Glycerinaldehyd-3-phosphorsäure + anorganisches Phosphat + DPN+

besteht *. Für jede ATP-Bestimmung wurden aliquote Mengen Perchlorsäureextrakt benutzt, die 0,5 ml M entsprachen. Die Genauigkeit der ATP-Bestimmung wurde durch fünf Parallelbestimmungen einer Mitochondriensuspension geprüft. Als Dispersion für eine Einzelbestimmung ergab sich 0,001 µMol ATP pro Milligramm Mitochondrien-N.

* Die Enzyme Phosphoglyceratkinase und Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase wurden als Test-Kombination von der Firma C. F. Boehringer & Soehne G. m. b. H., Mannheim, bezogen. Vergleichs-ATP war von der Firma Pabst Laboratories, Milwaukee, Wis. Mit diesen Enzymen werden neben ATP noch weitere Nucleosidtriphosphate im Versuchsansatz erfaßt, die aber mengenmäßig vermutlich von untergeordneter Bedeutung sind.

H. Antidiuretische Substanzen

Oxypressin: Mit der Synthese des V war der Weg zur Darstellung von aktiven analogen Polypeptiden gebahnt. Katsoyannis[92] im Laboratorium von Du Vigneaud konnte ein Oktapeptid herstellen, das sich nur in einer Aminosäure vom V unterscheidet (Abb. 6). Zum Unterschied vom V besitzt es

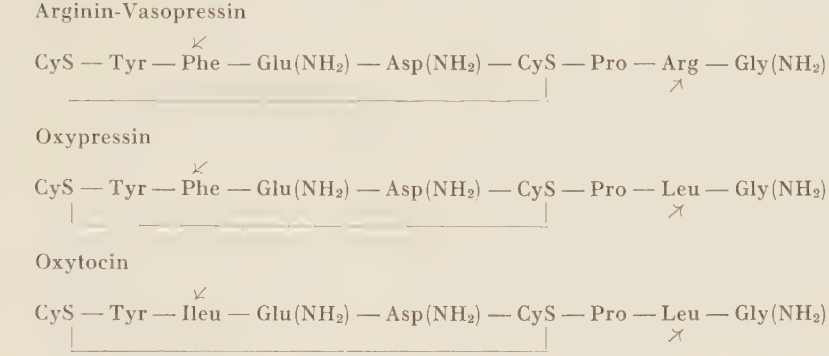


Abb. 6.

schwächere antidiuretische bei stärkeren oxytocischen Eigenschaften (Tabelle 3). Das Oxypressin — wie der Stoff genannt wird — kam in einem Teil dieser Versuche zur Anwendung, da dieses synthetische Präparat zur Verfügung stand *. Tonephin *: Dieses Präparat ist die vasopressorische Komponente des Hypophysenhinterlappenextraktes.

I. Statistische Beurteilung der Untersuchungsergebnisse

Für die einzelnen Prüfkollektive wurden folgende Parameter berechnet:

1. Mittlere Abweichung einer Einzelbeobachtung vom Mittelwert:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n-1}}$$

2. Mittlere Abweichung des Mittelwertes:

$$\varepsilon = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n\,(n-1)}}$$

3. Mittlere Fehler der Differenz zweier Mittelwerte:

$$k = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\varepsilon_1^2 + \varepsilon_2^2}};\ M = \text{Mittelwert.}$$

Aus einer Tabelle von Fisher[93] (eine ungekürzte Tabelle findet sich bei Burn[94]) wurde entnommen, mit welcher Wahrscheinlichkeit P eine Differenz zweier Mittelwerte signifikant ist.

* Die Präparate wurden von den Firmen Sandoz A. G., Nürnberg, und Farbwerke Hoechst A. G., Frankfurt am Main-Hoechst, zur Verfügung gestellt.

Ergebnisse

A. Oxypressin-Aufnahme von der isolierten Niere

In Tabelle 4 sind die analytischen Daten der Durchströmungsversuche zusammengefaßt, in denen 5 mE. O pro Gramm Niere der

Tabelle 4

Konzentrationsverlauf in der Durchströmungsflüssigkeit, Gehalt in der Niere und Ausscheidung im Harn nach einer Gabe von 5 mE. O pro Gramm Niere (Frischgewicht). Versuchsanordnung: Isolierte, überlebende Meerschweinchenniere

t in Minuten	O-Gehalt									
	Durchströmungsflüssigkeit (Halbblut) in % der verabreichten Dosis			Nierengewebe in mE. O Frischgewicht pro Gramm			in % der verabreichten Dosis	Ausscheidung im Harn in % der verabreichten Dosis		
	M	σ	n	M	σ	n		M	σ	n
0	100	—	18	—	—	—	—	—	—	—
1	88,1	11,0	12	—	—	—	—	—	—	—
2	51,3	11,7	7	—	—	—	—	—	—	—
3	26,6	6,9	7	0,70	0,18	8	14,0	2,2	0,9	12
5	13,2	4,7	18	0,52	0,22	8	10,4	4,8	2,1	9
8	5,7	4,0	7	—	—	—	—	—	—	—
10	2,4	1,3	12	—	—	—	—	—	—	—
11	—	—	—	0,15	0,90	8	3,0	5,2	2,0	9

Durchströmungsflüssigkeit zugesetzt worden sind. Die Ergebnisse sind (außer für Nierengewebe) in Prozent der verabreichten Dosis angegeben. Das ist darin begründet, daß mit einem vorgewählten Volumen Durchströmungsflüssigkeit gearbeitet wurde (12—15 ml, abhängig von der Größe des Meerschweinchens), um die Zeit zwischen Entnahme der Nieren aus dem Tier und dem Anschluß an die Apparatur nicht durch Meß- und Füllarbeiten zu verlängern. O wurde nach einer Kontrollperiode von fünf Minuten der Durchströmungsflüssigkeit hinzugefügt.

Die Abb. 7 zeigt die Analyse der Regressionskurve, die aus den O-Konzentrationen in der Durchströmungsflüssigkeit graphisch ermittelt wurde. In der oberen Kurve — der Mutterkurve — ist der Logarithmus der O-Konzentration als Funktion der Zeit aufgetragen. Diese Kurve kann durch sukzessive Subtraktion graphisch in zwei Exponentialkurven zerlegt werden. Für die Mutterkurve ergibt sich daraus die Gleichung $P = Ae^{-bt} + B^{-bt}$ (P ist die Plasmakonzentration zum Zeitpunkt t, a und b ist die Neigung der zwei Geraden im

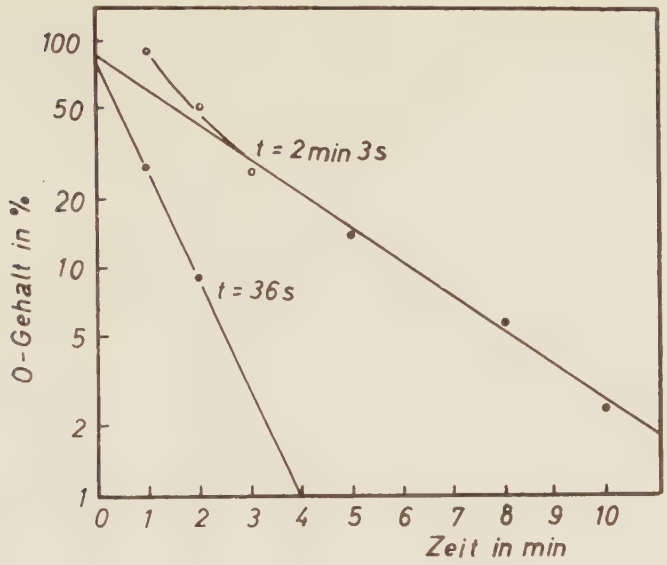


Abb. 7.

Analyse der Kurve, die den Abfall der O-Konzentration in der Durchströmungsflüssigkeit (Halbblut) zeigt. Die obere Original- oder Mutterkurve ist aus den Analysendaten aus Tabelle 4 gezeichnet worden. Die zwei geraden Linien zeigen die wichtigsten Exponentialkomponenten, die aus der Mutterkurve ermittelt worden sind. t = Halbwertszeit. (Erklärung vgl. Text.)

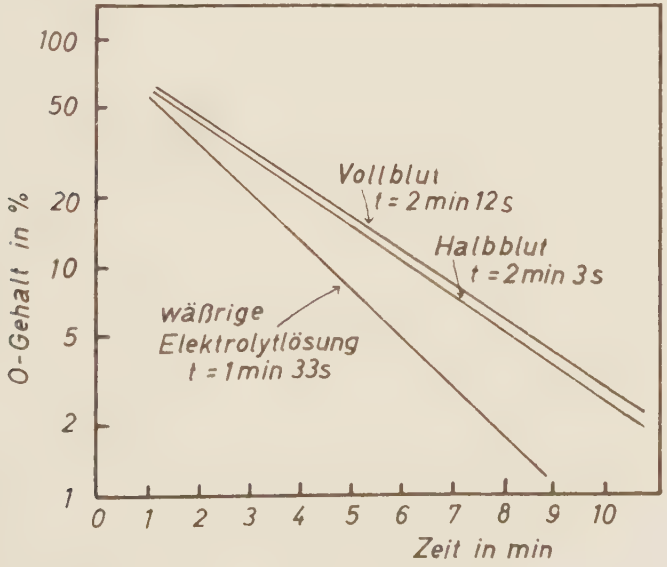


Abb. 8.

Renale Aufnahme von O aus wässeriger Elektrolytlösung (n = 3), aus Halbblut (n = 18) und aus Vollblut (n = 3). Angegeben ist der geradlinige Verlauf der Exponentialkurven im halblogarithmischen Maßstab. t = Halbwertszeit.

halblogarithmischen Ordinatensystem, A und B sind die extrapolierten Schnittpunkte dieser Geraden mit der x-Achse). Um von der Mutterkurve die zweite Exponentialkomponente abzutrennen, wird der gerade Teil dieser Kurve (etwa zwischen dritter und zehnter Minute) zur x-Achse verlängert. Die Differenz zwischen der Mutterkurve und dieser Geraden ist die zweite Komponente. Diese Analyse zeigt, daß mindestens zwei unabhängige Prozesse am Abfall der Konzentration der Durchströmungsflüssigkeit beteiligt sind.

Die Ursache der schnellen Exponentialkomponente (untere Gerade in Abb. 7) ist die mechanische Mischung des O in die Durchströmungsflüssigkeit. Sie ist die Folge der Eigenarten dieser Versuchsanordnung. Wird nämlich O vor Anschluß der Niere an die Durchströmungsapparatur dem Halbblut gleichmäßig beigemengt, dann fehlt diese Exponentialkomponente fast vollständig.

Die obere Komponente mit der langen Halbwertszeit wird im wesentlichen von der Aufnahmefähigkeit der Niere für O und von der Art der Durchströmungsflüssigkeit bestimmt. Die Bedeutung beider Komponenten wird offensichtlich, wenn die Zusammensetzung der Durchströmungsflüssigkeit geändert wird. Gelangt eine blutfreie Flüssigkeit zur Anwendung, dann ist die O-Aufnahme durch die Niere gegenüber Halbblut beschleunigt (verkürzte Halbwertszeit) (Abb. 8). Vermutlich tritt eine Bindung zwischen O und Blutbestandteilen ein, die den Verteilungskoeffizienten zwischen Durchströmungsflüssigkeit und Nierengewebe verändert.

Von Interesse ist in diesem Zusammenhang die Bindungskapazität des Blutes für O. Um einen Überblick zu erhalten, wurde unter gleichen Bedingungen das Halbblut durch Vollblut ersetzt. Wenn ein Teil der O-Menge im Halbblutversuch ungebunden vorliegen würde, dann könnte bei Vollblut mit einer Verlängerung der Halbwertszeit gerechnet werden. Beide Versuchsreihen stimmen jedoch weitgehend überein (Abb. 8). Danach müssen die in diesem Versuch benutzten 6 ml Meerschweinchenblut 5—20 mE. antidiuretische Polypeptide binden können.

Bei den Durchströmungsversuchen mit Halbblut konnte eine Antidiurese nicht sicher beobachtet werden. Die Ursache liegt vermutlich im niedrigen onkotischen Druck dieser Flüssigkeit. Bei der Verwendung von Vollblut konnte dagegen eine fast komplette Harnsperre festgestellt werden. Das Fehlen der Diuresehemmung bei der Mehrzahl dieser Versuche ist von Vorteil gewesen, da die Kinetik der Aufnahme und Ausscheidung durch schwankende Harnmengen nicht gestört wurde.

B. Oxypressin-Gehalt in der Niere und Ausscheidung mit dem Harn

Die Frage nach dem Gehalt antidiuretischer Polypeptide in der Niere haben mehrere Untersucher (zusammenfassend bei Heller

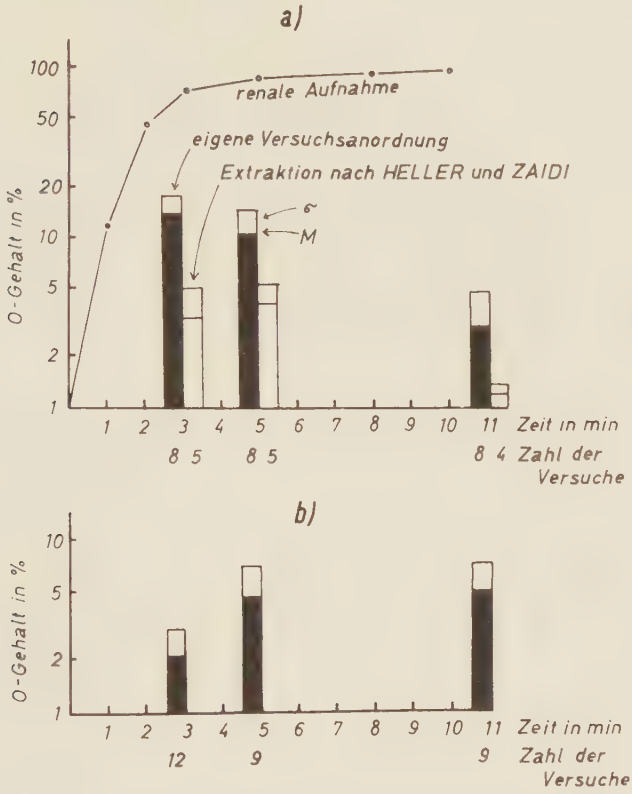


Abb. 9.

O-Gehalt in der Niere und Ausscheidung mit dem Harn. Versuchsanordnung: Isolierte, überlebende Niere. a Renale O-Aufnahme aus der Durchströmungsflüssigkeit (Differenz zwischen verabreichter Dosis und Gehalt in der Durchströmungsflüssigkeit). Die Säulen geben den effektiven, direkt bestimmten O-Gehalt im Nierengewebe an. Schwarze Säulen: Eigenes Extraktionsverfahren. Weiße Säulen: Methode von Heller und Zaidi[95]. b Harnausscheidung des O. Alle Angaben sind in Prozenten der verabreichten Dosis. Den Säulen sind die σ-Werte aufgesetzt.

und Zaidi[95]) in der Vergangenheit verfolgt. Die Ergebnisse brachten jedoch keinen wesentlichen Fortschritt: Entweder mißlang der Hormonnachweis oder von einer injizierten V-Dosis wurden aus noch unbekannten Gründen sehr geringe Mengen wiedergefunden.

In diesen Versuchen wurde O mit einem Extraktionsverfahren aus der Niere gewonnen, das eine große Ausbeute gewährleistet. Die Entnahme der Organe aus der Durchströmungsapparatur und die Abkühlung auf 0^0 C konnte außerdem in wenigen Sekunden erfolgen, so daß Verluste bei der Aufarbeitung der Gewebe weitgehend vermieden wurden.

In Abb. 9 sind die Ergebnisse von 24 Versuchen im halblogarithmischen Maßstab zusammengestellt. Die Organe wurden mit 5 mE. O pro Gramm Niere (Frischgewicht) durchströmt. Die obere Kurve (Abb. 9 a) beschreibt die renale Aufnahme, die Differenz zwischen der Dosis und der Konzentration in der Durchströmungsflüssigkeit. Einzelheiten darüber wurden im vorangehenden Abschnitt mitgeteilt. Den tatsächlichen Gehalt in der Niere zeigen die Säulen der Abb. 9 a. Diese Werte sind aus direkten Messungen im Nierengewebe. Drei Minuten nach Beginn der Versuche ist ein maximaler O-Gehalt in der Niere zu beobachten, jedoch auch nach zehn Minuten ist noch eine geringe O-Menge nachweisbar.

Die O-Konzentrationen in der Niere sind nicht durch die Eigentümlichkeit des O-Moleküls bedingt. Auch V zeigt einen ähnlichen Konzentrationsverlauf — wie durch Kontrollbestimmungen mit Tonephin (der vasopressorischen Komponente des Hypophysenhinterlappen-Extraktes) gefunden werden konnte.

Zum Vergleich sind einige Bestimmungen mit einem neulich beschriebenen Extraktionsverfahren für antidiuretische Polypeptide von Heller und Zaidi[95] angeführt (Abb. 9 a). Sie hatten neben der Kontrolle der eigenen Methode die Aufgabe zu zeigen, welche Bedeutung das Extraktionsverfahren auf das Ergebnis von O-Bestimmungen im Gewebe hat. Das Verfahren von Heller und Zaidi unterscheidet sich von dem hier verwendeten vor allem in der Dauer der Dialyse, der Wasserstoffionenkonzentration bei der Fällung von Verunreinigungen und der Temperatur beim Konzentrieren des Extraktes. Die Ergebnisse mit dem Verfahren von Heller und Zaidi sind signifikant niedriger ($P < 0{,}01$).

Es mag erwähnt sein, daß der Polypeptid-Gehalt der Niere nicht durch O-Mengen der Durchströmungsflüssigkeit oder des Harns, die sich am Ende der Versuche im Gewebe befanden, vorgetäuscht wird. In allen Experimenten wurde die Durchströmungsflüssigkeit mit 2 ml O-freier Flüssigkeit aus dem Gewebe gespült. Dazu wurde die Niere noch mit Filterpapier ausgedrückt. Die gewebsfremden O-Konzentrationen sind außerdem drei Minuten nach Beginn der Ver-

suche in der Durchströmungsflüssigkeit bereits so gering, daß mit einem erheblichen Fehler nicht gerechnet werden müßte.

Ein großer Teil der aufgenommenen O-Menge entzieht sich der Extraktion und dem biologischen Nachweis. Über den Verbleib sagen die bisherigen Versuche nichts aus. Es ergibt sich die Frage, ob O mit dem Harn ausgeschieden wird. Einzelheiten über die antidiureti-

Tabelle 5

μE. O pro Milligramm Eiweiß-N in den Zellfraktionen aus Meerschweinchennieren (in Klammern σ-Werte)

Dosis mE. pro Gramm Niere (Frischgewicht)	Zahl der Versuche	Zellfraktion			Gesamt *	Wiedergefundene O-Menge in % **
		Kernfraktion	Mitochondrienfraktion	Überstehendes (Cytoplasma und Mitochondrien)		
5	20	5,8 (1,6)	8,7 (2,4)	23,8 (6,1)	16,1	72
10	18	7,9 (2,1)	17,8 (3,1)	32,6 (5,7)	24,8	80

* Berechnet aus dem Gesamt-N- und Gesamt-O-Gehalt.

** Als 100%-Wert wurde der O-Gehalt der Niere nach drei Minuten aus Tabelle 4 verwendet, der ein Mittelwert aus acht Versuchen ist.

sche Aktivität im Harn sind aus der Tabelle 4 und Abb. 9 b zu entnehmen. Während einer Versuchsdauer von zehn Minuten wurden 5,2% ausgeschieden. Die größte Menge war in den ersten fünf Minuten — etwa parallel zum effektiven O-Gehalt in der Niere — nachweisbar.

C. Verteilung von Oxypressin in der Niere

In den vorausgegangenen Durchströmungsversuchen wurde regelmäßig O in der Niere nachgewiesen. Der Gipfelwert konnte in der dritten Minute gemessen werden. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Verteilung in der Niere bestimmt.

In 38 Durchströmungsversuchen wurden Meerschweinchennieren mit 5 bzw. 10 mE. O pro Gramm Niere beladen und in seine subzellulären Partikel fraktioniert. Da alle Manipulationen bei 0—2° C ausgeführt wurden, war kaum mit einer Inaktivierung des O zu rechnen.

Tabelle 5 enthält den O-Gehalt der Nierenfraktionen, bezogen auf Eiweiß-N. In allen Versuchen mit beiden Dosierungen konnte die größte O-Menge im Überstehenden, der Zytoplasma-Mikrosomen-

Fraktion, gefunden werden. Den geringsten Gehalt hatte die Zellkern-Fraktion. Einen Zwischenwert nahm die Mitochondrien-Fraktion ein.

In separaten Versuchen wurde der Frage nachgegangen, ob diese Verteilung der Polypeptide auf die Zellfraktionen den intrazellulären Verhältnissen entspricht oder während der Aufarbeitung

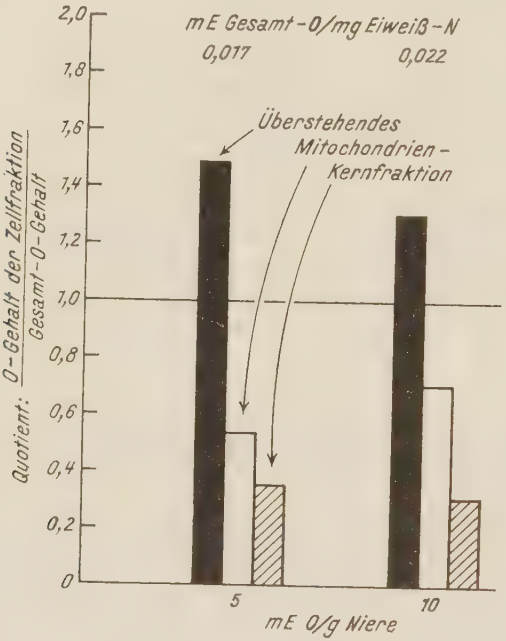


Abb. 10.
Beziehungen zwischen dem O-Gehalt der Zellfraktionen und dem Gesamt-O-Gehalt nach 5 und 10 mE. O pro Gramm Niere.

des Gewebes entstanden ist: Auffällig ist bereits das konstante Verhältnis

$$\frac{\text{O-Gehalt in der Zellfraktion}}{\text{Gesamt-O-Gehalt}}$$

(Abb. 10) in allen Zellfraktionen bei beiden Dosierungen. Offenbar ist das Polypeptid fest an die Fraktionen gebunden, so daß ein Ausgleich der Konzentrationen nur schwer möglich ist. Diese Ansicht wird bestätigt, wenn man versucht, O aus den Zellfraktionen auszuwaschen: So fiel der O-Gehalt der Mitochondrien-Fraktion nach einer zweimaligen zusätzlichen Waschung lediglich von 7,6 auf 6,7 μE. O pro Milligramm Mitochondrien-Eiweiß-N. Obgleich diese stabile Fixierung für eine intrazelluläre Verteilung spricht, so scheint

es doch notwendig, einen direkten Nachweis zu führen. Dafür eignet sich ein Kreuzversuch:

Wenn eine O-freie Zellkern- und Mitochondrien-Fraktion mit einer O-haltigen Zytoplasma-Mikrosomen-Fraktion zusammengegeben werden, dann entsteht eine Mischung, die dem Homogenat vor der Zellfraktionierung entspricht. Wird erneut in den Zellkomponenten aufgetrennt, dann kann aus dem nunmehr bestimmten O-Gehalt der Fraktionen geschlossen werden, ob die Polypeptidverteilung während der Aufarbeitung entstanden ist oder schon vorher existierte.

Folgende Verteilung wurde vor und nach erneuter Zellfraktionierung gefunden (Angaben in μE./mg Eiweiß-N):

	vorher in Stufe 1	nachher in Stufe 3
O-haltiges Überstehendes der Zytoplasma-Mikrosomen-Fraktion	25	23
O-freie Zellkernfraktion	—	< 2
O-freie Mitochondrien-Fraktion	—	< 2

Der O-Gehalt in Stufe 3 zeigt, daß sich an der Polypeptidverteilung praktisch nichts geändert hat. Die in Tabelle 6 mitgeteilten O-Mengen in den Zellkomponenten sind demnach kaum künstlich während der Zellfraktionierung, sondern wahrscheinlich bereits bei

der Durchströmung der Niere in die Zellen gelangt. Offenbar kann ein Teil des O außerordentlich rasch in die Zelle eindringen — vielleicht durch Schädigung der Zellgrenzflächen — und von den Zellkomponenten gebunden werden.

Während der Zellfraktionierung werden die Komponenten mehrfach gewaschen. Wenn trotzdem eine O-Ausbeute von 72 bzw. 80% (Tabelle 5) gefunden werden konnte, dann spricht dies für eine feste Bindung des O an die Zellbestandteile. Bekräftigt wird diese Vor-

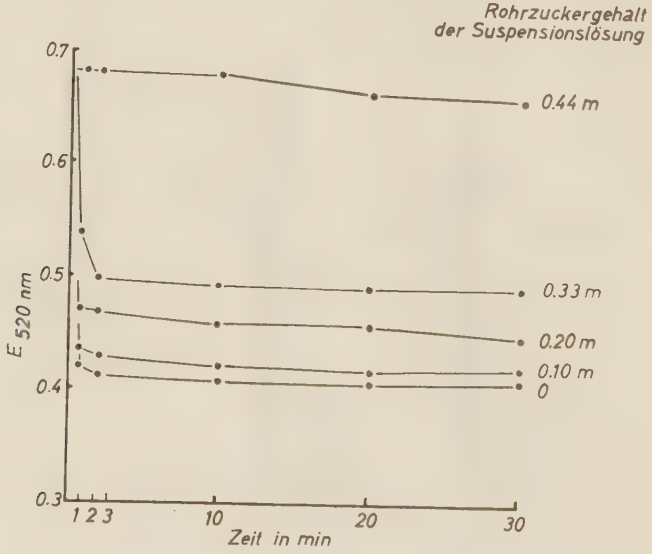


Abb. 11.
Abhängigkeit der Mitochondrienschwellung vom osmotischen Druck der Suspensionsflüssigkeit. Milieu: Rohrzuckerlösung mit 0,016 m Tris-Puffer (Trihydroxymethylaminomethan), pH 7,4. Zimmertemperatur. Versuchsreihe aus einer Mitochondrienpräparation. Ordinate: Extinktion bei 520 nm. Abszisse: Zeit in Minuten.

stellung durch die weiter oben beschriebene zweimalige Waschung der Mitochondrien-Fraktion, wobei der O-Gehalt ebenfalls nur unwesentlich abfiel.

D. Hemmung der osmotischen Schwellung durch Oxypressin

Zunächst wurde die Reaktion der Nierenmitochondrien auf einige physikalische und chemische Einflüsse untersucht. Dies war notwendig, da Partikel aus Nierengewebe bisher verhältnismäßig selten im Mittelpunkt von Untersuchungen über den Wasserhaushalt

gestanden haben und außerdem geringfügige Variationen bei der Präparation das Verhalten der Mitochondrien sehr verändern können.

Wird die Rohrzuckerkonzentration in einer Mitochondrienaufschwemmung von 0,44 auf 0,4 m herabgesetzt, dann bewahren intakte Granula ihr Volumen: Sie können das Eindringen von Wasser

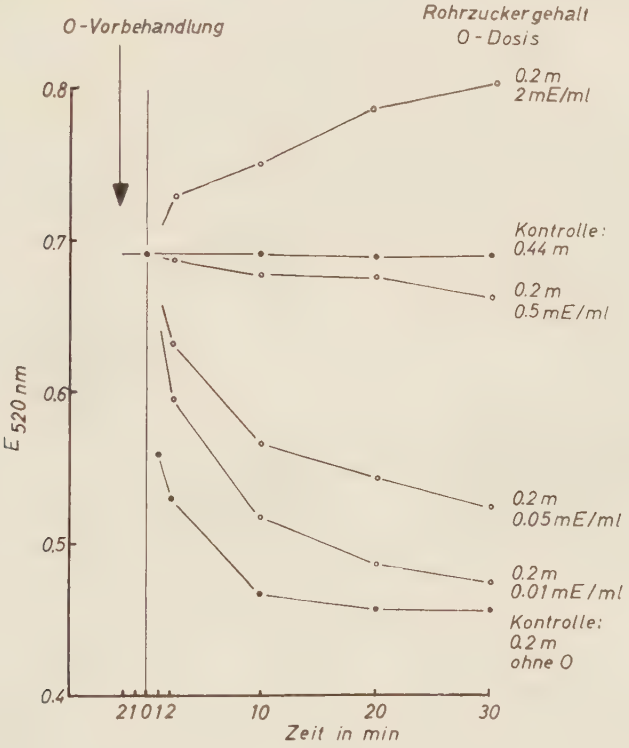


Abb. 12.

Hemmung der osmotischen Mitochondrienschwellung durch verschiedene O-Konzentrationen nach Vorbehandlung. Milieu: 0,2 m Rohrzuckerlösung mit 0,016 m Tris-Puffer, pH 7,4. Zimmertemperatur. Versuchsreihe aus einer Mitochondrienpräparation. Zum Vergleich Kontrollsuspension mit 0,44 m Rohrzuckergehalt. O in mE. pro Milliliter Ansatz. Ordinate: Extinktion bei 520 nm. Abszisse: Zeit in Minuten.

verhindern. Erst bei stärkerer Verdünnung der Suspensionsflüssigkeit setzt eine Schwellung ein (Abb. 11). Die Volumenzunahme erfolgt dabei in der Regel in wenigen Sekunden. Anschließend verändert sich das Volumen nur noch sehr langsam. In diesen Verdünnungsversuchen entspricht ein bestimmter Schwellungsgrad einem osmotischen Druck der Suspensionsflüssigkeit. Wird die Rohrzuckerkonzentration wieder auf isotonische Verhältnisse erhöht, so ist die

Volumenzunahme nur in einem geringen Maße rückgängig. Nach einer Schwellungszeit von 5—10 Minuten ist sie irreversibel.

Eine ähnliche Schwellung — wie sie in verdünnter Rohrzuckerlösung eintritt — kann auch mit hypotonischen Mannit-, NaCl- oder KCl-Lösungen beobachtet werden. Dies stimmt mit Vorstellungen von

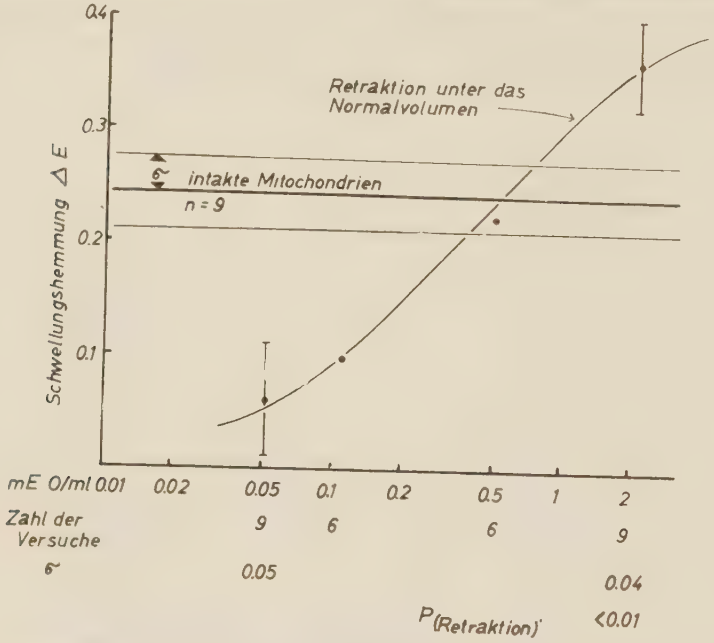


Abb. 13.
log-Dosis-Wirkungskurve der Schwellungshemmung und Retraktion durch O. Milieu: 0.2 m Rohrzuckerlösung mit 0.016 m Tris-Puffer, pH 7,4. Zimmertemperatur. Schwellungsdauer zehn Minuten. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus mehreren Mitochondrienpräparationen. Zum Vergleich ist das Volumen intakter Mitochondrien in 0,44 m Rohrzuckerlösung eingetragen. Die Ergebnisse der extremen O-Konzentration sind mit σ-Werten angegeben. Ordinate: Schwellungshemmung △E (Differenz zwischen Schwellung durch 0,2 m Rohzuckerlösung mit und ohne O). Abszisse: O-Gehalt pro Milliliter Versuchsansatz, fernerhin die Anzahl der Versuche, der σ-Wert für die Schwellungshemmung △E und der Wert P (der die Wahrscheinlichkeit angibt, ob die Differenz zwischen den Ergebnissen mit und ohne O durch den Fehler der Auswahl bedingt ist).

Raaflaub[97]; Tedeschi und Harris[114] und anderen Untersuchern[115–118] überein. Nach diesen Autoren soll diese Schwellungsform vor allem osmotischer Natur sein und wenig von spezifischen Stoffeigenschaften geprägt werden.

Die engen Beziehungen des antidiuretischen Hormons zum osmotischen Druck des Endharns haben zu der Frage geführt, ob dieses Polypeptid die osmotische Schwellung der Mitochondrien beeinflussen kann.

Es war von vornherein wenig wahrscheinlich, daß O und V die Wasseraufnahme in vitro verändern, wenn diese Stoffe zu Beginn oder während der osmotischen Schwellung zum Versuchsansatz gegeben werden. Gegen diese Möglichkeit spricht die rasche und nahezu irreversible Wasseraufnahme der Mitochondrien. Tatsächlich haben beide Stoffe auf schwellende Partikel dann keinen bemerkenswerten Einfluß, wenn die osmotische Schädigung in Gang gekommen ist.

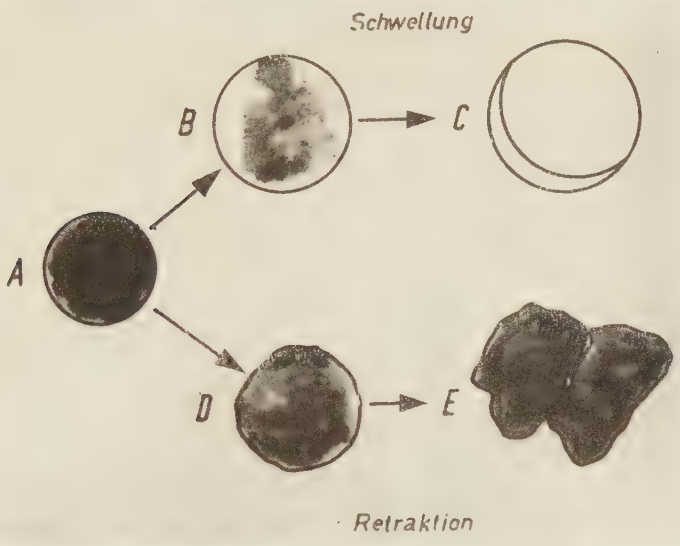


Abb. 14.
(Erklärung im Text.)

Durch Vorbehandlung der Mitochondrien mit antidiuretischen Polypeptiden kann die Schwellung jedoch verzögert oder ganz gehemmt werden. Für die Vorinkubation genügt eine Zeit von einer bis fünf Minuten bei Zimmertemperatur. Die Abb. 12 und 13 zeigen die Ergebnisse mehrerer Versuchsreihen, in denen die osmotische Schwellung durch 0,25 m Rohrzuckerlösung mit verschiedenen O-Konzentrationen gehemmt wurde. Tonephin verhält sich ganz analog. Auffälligerweise sind die antidiuretischen Dosen beider Stoffe auch hinsichtlich ihres Einflusses auf die Nierenschwellung wirkungsgleich.

Mit hohen O-Konzentrationen gelingt es nicht nur, die Schwellung zu verhindern, vielmehr tritt eine Volumenverminderung (Retraktion) unter das Normalvolumen intakter Partikel ein. Diese Ver-

kleinerung der Mitochondrien ist nicht erheblich, aber signifikant unterschiedlich vom Volumen in 0,45 m Rohrzuckerlösung ($P = < 0{,}01$, Abb. 12 und 13).

Die osmotische Volumenänderung der Mitochondrien und die O-Wirkung werden durch phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen bestätigt. Intakte Mitochondrien zeigen sich dabei als dichte, homogene Scheiben von sphärischer Gestalt (Abb. 14 A). Bei der osmotischen Schwellung lockern sich die Mitochondrien zunächst auf (Abb. 14 B). Bei stärkerer Schwellung wird der Inhalt in kompakter Sichelform — unter starker Vergrößerung der Partikel — an die Membran gedrängt (Abb. 14 C).

Bei niedrigen O-Dosen nehmen die Mitochondrien die Gestalt an, die dem jeweiligen Schwellungsgrad entspricht. Durch hohe Dosen tritt dagegen Schrumpfung (Abb. 14 D) und später Agglutination der Partikel ein (Abb. 14 E). Die Volumenretraktion kann dann gesehen werden, wenn auch der spektralphotometrische Trübungswert eine Retraktion vermuten läßt.

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Versuche an Mitochondrien, daß antidiuretische Polypeptide einen Schutz gegen die osmotische Wasseraufnahme der Partikel ausüben.

E. Abhängigkeit der Oxypressin-Wirkung vom osmotischen Druck der Suspensionsflüssigkeit

Nach Abb. 11 ist das Ausmaß der Schwellung der Mitochondrien eine Funktion des osmotischen Druckes der Suspensionsflüssigkeit. Es liegt nahe, daß die O-Wirkung dazu in quantitativer Beziehung steht. Diese Ansicht konnte bestätigt werden, indem verschieden konzentrierte Suspensionslösungen mit 0,1 mE. O pro Milliliter Mitochondrienansatz inkubiert wurden. In Abb. 15 a sind die Ergebnisse zusammengestellt. Die Volumenveränderungen sind in Extinktionsdifferenzen $\triangle E$ angegeben. Kurve 1 zeigt die Schwellung nach Vorbehandlung mit O. Zum Vergleich ist in Kurve 2 die Schwellung ohne O-Zugabe dargestellt. Die Differenz zwischen Kurve 1 und 2 ist die Schwellungshemmung durch O. Sie ist in Kurve 3 wiedergegeben. — In diesem Diagramm steigt von links nach rechts die Rohrzuckerkonzentration an. In umgekehrter Richtung wächst die osmotische Belastung der Mitochondrien. Die Abb. 15 a, Kurve 3, läßt erkennen, daß die Hemmung der Schwellung mit abnehmender osmotischer Belastung zunimmt, d. h. O hemmt bei leichter osmotischer Belastung die Schwellung besser als bei einer schweren Schädigung des Partikels. Diese Beziehung kommt eindrucksvoll zur

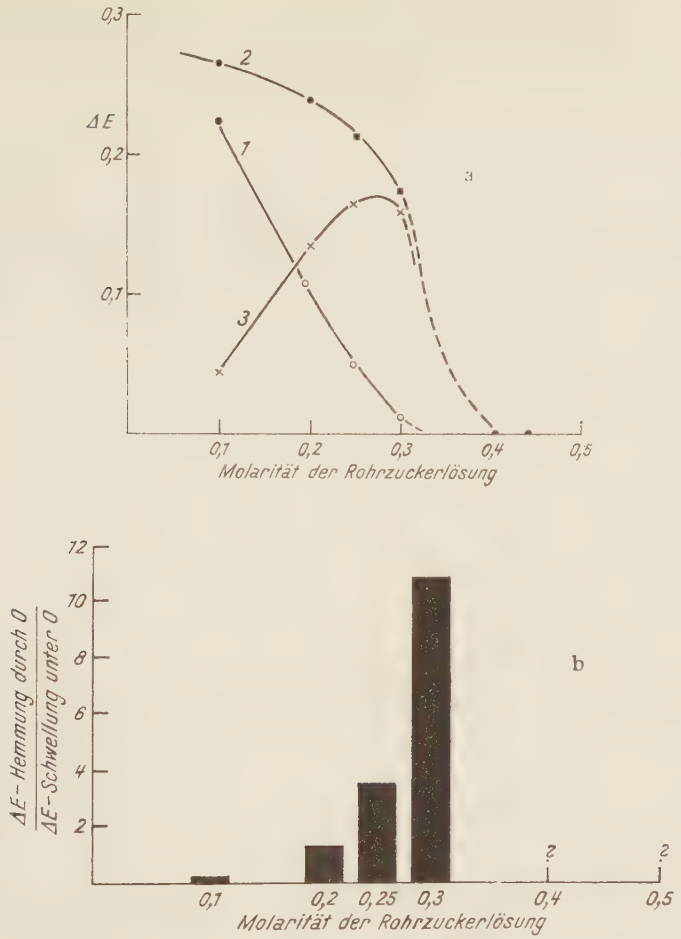


Abb. 15 a und b.

Beziehungen zwischen O-Wirkung und osmotischem Druck der Suspensionsflüssigkeit. Milieu: Verschiedene Rohrzuckerlösungen mit 0,016 m Tris-Puffer, pH 7,4. Zimmertemperatur. Schwellungsdauer: 10 Minuten. O-Konzentration 0,1 mE./ml Ansatz. Die Angaben sind Mittelwerte aus je sechs Bestimmungen von verschiedenen Mitochondrienpräparationen. a Schwellung mit (Kurve 1) und ohne (Kurve 2) O. Kurve 3 Differenz von Kurve 1 und 2. Abszisse: Wirkung in Extinktionswerten. b Verhältnis der Kurven $\frac{(3)}{(1)}$, als Maß der Empfindlichkeit osmotisch geschädigter Mitochondrien gegen O.

Geltung, wenn der Quotient von den Extinktionswerten der Kurve 1 und 3 gebildet wird: $Q = \frac{\triangle E \text{ Hemmung durch O}}{\triangle E \text{ Schwellung unter O}}$. Das Verhältnis gibt an, wievielmal die Hemmung größer oder kleiner ist als die resultierende Schwellung unter O. Der Quotient ist ein Maß für die

Empfindlichkeit der Mitochondrien gegen O bei verschieden starker osmotischer Belastung. Das Ergebnis sind die Säulen in Abb. 15 b. Sie steigen zwischen 0,1 und 0,3 m steil an. Besonders bemerkenswert ist der Quotient für 0,3 m Rohrzuckerlösung. Obwohl bei dieser

Tabelle 6

Abhängigkeit der O-Hemmung vom Alter der Mitochondrien. Milieu: 0,2 m Rohrzuckerlösung mit 0,016 m Tris-Puffer, pH 7,4, Zimmertemperatur. Alle Angaben in ΔE nach einer Schwellungsdauer von 10 Minuten. Versuchsreihe A: 0,2 mE. O pro Milliliter Ansatz. Versuchsreihe B: ohne O

	Zeit in Minuten					
	10	20	30	40	50	60
A	0,10 $n = 7$ $\sigma = 0{,}01$	0,10	0,12	0,13	0,13	0,16
B	0,25 $n = 7$ $\sigma = 0{,}025$ $P(A:B) < 0{,}01$	0,25	0,24	0,21	0,16	0,16

Konzentration die Hemmungskurve (Kurve 3, Abb. 15 a) bereits wieder abfällt, steigt der Empfindlichkeitsquotient erheblich weiter an.

F. Oxypressin-Wirkung und Alterung der Mitochondrien

Normale Mitochondrien können in hypotonischen Lösungen bis zu einem maximalen Volumen anschwellen, auch wenn bereits eine spontane partielle Wasseraufnahme eingetreten ist — wie sie z. B. durch Schädigung der Mitochondrien bei höheren Temperaturen beobachtet werden kann. So schwellen bei Zimmertemperatur aufbewahrte Granula noch mehrere Stunden nach der Mitochondrien-Präparation, wenn der osmotische Druck der Suspensionsflüssigkeit herabgesetzt wird. Die Hemmung der Wasseraufnahme durch O ist dagegen nur kurze Zeit nach der Gewinnung der Granula aus Nierengewebe möglich. Bereits nach einer Alterung von 30—60 Minuten kann die Empfindlichkeit gegen O vollkommen verloren gegangen sein.

Näheren Einblick in diese Zusammenhänge gaben Versuche, in denen 0,2 mE. O pro Milliliter Mitochondrienansatz an Partikel von unterschiedlichem Alter geprüft wurden. In Tabelle 6 ist die Schwellung mit und ohne O-Vorbehandlung zusammengestellt. Die Ergeb-

nisse sind Mittelwerte aus sieben Versuchsreihen einer Mitochondrienpräparation. Bei frischen Mitochondrien führt O zu einer signifikant verminderten Wasseraufnahme. Mit der Alterung nimmt der O-Effekt ab. Nach 60 Minuten sind die Partikel in diesen Versuchen unempfindlich.

Aus beiden Versuchsreihen geht fernerhin hervor, daß die Zeitspanne der befristeten O-Hemmung keine Beziehung zur Spontanschwellung durch Alterung hat, sonst müßte sich in diesen Versuchen die O-Kurve mit der Spontanschwellung bei $\triangle E = 0{,}10$ treffen. Vielmehr gleichen sich die Kurven nach 60 Minuten bei $\triangle E = 0{,}16$ an und zeigen anschließend übereinstimmende Alterungserscheinungen. Der Verlust der Empfindlichkeit der Mitochondrien gegen O läuft demnach der Spontanschwellung durch Alterung zwar parallel, tritt jedoch wesentlich früher ein.

G. Oxypressin-Wirkung und Oxypressin-Gehalt im Mitochondrienansatz

In einem vorausgegangenen Abschnitt (Ergebnisse A) wurde über die Aufnahme des O durch Nierengewebe berichtet und dabei eine große Differenz zwischen dem aufgenommenen und dem wiedergefundenen O nachgewiesen. Heller und Zaidi[95] haben aus anderen Versuchen indirekt ein ähnliches Mißverhältnis beobachtet. Diese Resultate führen zu der Frage, wie die langdauernde V-Antidiurese zustande kommt, obgleich das Organ nur vorübergehend geringe Hormonmengen enthält.

Die Mitochondrienschwellung bietet eine Möglichkeit, diese Beziehungen zwischen Wirkung und Hormongehalt nachzuprüfen. Die Wasseraufnahme wurde durch 0.2 mE. O pro Milliliter Ansatz gehemmt. Um die Wirkungsdauer zu verlängern, wurden diese Versuche bei 12^0 C ausgeführt. Parallel wurde der Polypeptidgehalt im Ansatz bestimmt.

Wie die Abb. 16 zeigt, ist der O-Effekt etwa 40 Minuten nahezu unverändert zu beobachten, um dann langsam abzuklingen. Im Gegensatz zur Schwellungskurve fällt der O-Gehalt im Ansatz steil ab — wie der untere Teil der Abb. 15 zeigt. Bereits nach wenigen Minuten läßt sich kein O mehr nachweisen.

Der Kurvenverlauf der Schwellungshemmung und die O-Konzentrationen im Mitochondrienansatz verhalten sich somit wie die Beziehungen zwischen Antidiurese und Hormongehalt in der isolierten Niere oder in vivo.

H. Veränderungen des Kalium-, Natrium- und ATP-Gehaltes während der Hemmung der osmotischen Schwellung durch Oxypressin

Neuere Untersuchungen [96] über die Eigenschaften der Mitochondrien zeigen, daß diese Granula verschiedene Stoffe anreichern oder sezernieren können. So werden Wasser — wie auch in den vorangegangenen Untersuchungen zum Ausdruck gekommen ist — und

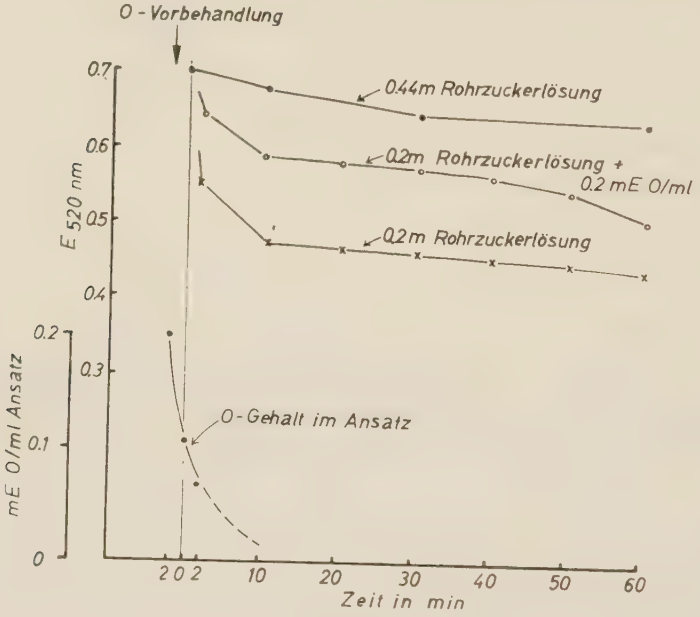


Abb. 16.
O-Hemmung und O-Gehalt im Mitochondrienansatz. Milieu: 0,2 m Rohrzuckerlösung mit 0,016 m Tris-Puffer, pH 7,4 (Kontrollversuch mit 0,44 m Rohrzuckergehalt). Temperatur 12° C. O-Konzentration: 0.2 mE./ml Ansatz. Außer dem Kontrollversuch sind alle Angaben Mittelwerte aus vier bis sechs Versuchen.

einzelne Kationen gegen einen Konzentrationsgradienten festgehalten. Diese energiefordernden Eigenschaften sind anscheinend mit der oxydativen Phosphorylierung direkt verbunden.

Bei der Mitochondrienschwellung sind diese beiden Funktionen der Partikel — Energiestoffwechsel und Sekretion — entweder direkt geschädigt oder sekundär in Mitleidenschaft gezogen. Seit Raaflaub [97] ist näher bekannt, daß verschiedene Formen der Schwellung durch ATP verhindert werden können. Es war deshalb nicht überraschend, daß bei der Spontanschwellung der Lebermitochondrien ein Verlust des ATP aus den Partikeln der Wasseraufnahme voraus-

geht [98]. Offenbar besteht eine ursächliche Beziehung zwischen ATP-Verlust und Schwellung. Bei der osmotischen Volumenzunahme ist durch den raschen Eintritt der Schwellung die zeitliche Folge der Ereignisse nicht so übersichtlich. Jedoch auch dabei vermindert sich während der Wasseraufnahme der ATP-Gehalt in den Mitochondrien.

Tabelle 7

Veränderungen des K-, Na- und ATP-Gehaltes bei der Hemmung der osmotischen Schwellung durch O. Milieu: 0,2 m Rohrzuckerlösung mit 0,016 m Tris-Puffer, pH 7,4, Zimmertemperatur. O-Konzentration: 0,2 mE./ml Ansatz. K, Na und ATP wurden vor und zwei Minuten nach Beginn der Schwellung gemessen. Alle Angaben sind in μMol/mg Mitochondrien-N (n = Zahl der Versuche)

	Vor Beginn der Schwellung		2 Minuten nach Beginn der Schwellung					
	Gehalt in Mitochondrien-Fraktion		ohne O-Vorbehandlung Gehalt in Mitochondrien-Fraktion		mit O-Vorbehandlung Gehalt in Mitochondrien-Fraktion		Gehalt im gesamten Versuchssatz	
	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ
K	0,74 (n = 12)	0,11	0,26 (n = 6)	0,08	0,34 (n = 6)	0,10	—	—
Na	0,27 (n = 12)	0,05	0,07 (n = 6)	0,03	0,09 (n = 6)	0,04	—	—
ATP	0,038 (n = 9)	0,007	0,014 (n = 9)	0,006	0,021 (n = 6)	0,004 P<0,01	0,031 (n = 6)	0,005 P 0,01

Synchron zur Schwellung treten Kalium und Natrium in die Suspensionsflüssigkeit über.

Auch Nierenmitochondrien verhalten sich bei der osmotischen Schwellung grundsätzlich ähnlich: Der ATP-Gehalt nimmt in den Partikeln ab und Kalium und Natrium diffundieren in die Suspensionsflüssigkeit (Tabelle 7).

Die Hemmung der osmotischen Schwellung durch O — die einer Stabilisierung des Wasserhaushaltes gleichkommt — läßt es denkbar erscheinen, daß antidiuretische Polypeptide in die Permeabilitätsverhältnisse für Kalium und Natrium und in den ATP-Stoffwechsel eingreifen.

Die Tabelle 7 zeigt den Kalium-, Natrium- und ATP-Gehalt in den Mitochondrien vor und nach Eintritt der Schwellung. Wird die Schwellung durch O gehemmt, dann ändert sich merkwürdigerweise wenig an dieser Verteilung. Der Austritt von Kalium und Natrium wird nicht signifikant verhindert, wenngleich die Resultate etwas höher liegen als die Kontrollbestimmungen. Lediglich ATP wird in höherer Konzentration in den O-stabilisierten Partikeln gefunden

($P < 0{,}01$). Trotzdem erreicht der Polyphosphatgehalt nicht annähernd die Normalwerte. Eine geringfügige Korrektur können die Werte in Tabelle 7 erfahren, wenn berücksichtigt wird, daß der Gehalt auf Mitochondrien-N bezogen ist, der sich unter O ebenfalls etwas ändert.

Aus diesen Versuchen ist das unterschiedliche Verhalten des Wasser- und Mineralhaushaltes unter O eindeutig. Das Polypeptid scheint danach keine allgemeine Stabilisierung der Mitochondrienfunktion auszulösen, sondern die Wasseraufnahme selektiv zu hemmen.

Kalium und Natrium diffundieren aus schwellenden Partikeln in die Suspensionsflüssigkeit. Für das Verhalten der ATP gibt es mehrere Möglichkeiten. Das Polyphosphat könnte den Weg der Na- und K-Ionen gehen und aus den Mitochondrien austreten. Es wäre jedoch auch denkbar, daß ATP in den Partikeln durch ATPasen abgebaut oder in strukturerhaltenden Stoffwechselprozessen verwendet wird.

Bilanzversuche im Mitochondrienansatz konnten das Schicksal der ATP weitgehend klären. Wird zwei Minuten nach Eintritt der Schwellung mit und ohne O der gesamte Ansatz lyophilisiert und auf seinen ATP-Gehalt untersucht, dann zeigt sich, daß dem Abfall der ATP in den Mitochondrien ein Anstieg in der Suspensionsflüssigkeit parallel geht (Tabelle 7). Mit der Konzentrationsverschiebung aus dem Mitochondrieninnern in die Suspensionsflüssigkeit kann ein großer Teil des ATP-Verlustes in den Granula erklärt werden, zumal wenn man berücksichtigt, daß ein weiterer Teil vermutlich in der Suspensionsflüssigkeit rasch durch ATPasen abgebaut wurde.

Besprechung

Tierversuche über die Verteilung des V im Organismus wurden meist mit der Absicht vorgenommen, die Gewebe kennenzulernen, in denen das Hormon wirkt. Dieses Ziel konnte durch zahlreiche Versuche [95–102] erreicht werden, in denen der Hormongehalt im Blut vor allem bei normalen und nephrektomierten Ratten verglichen wurde. Im Vordergrund der Beobachtungen stand Größe und Geschwindigkeit der Hormonaufnahme durch Nieren und Leber. Ergänzende direkte Gehaltsbestimmungen [95] in Organen wurden erst in jüngster Zeit versucht. Die Ursachen dieser Entwicklung dürften vor allem in analytischen Schwierigkeiten zu suchen sein.

Bei der Verteilung des V nimmt die Niere unten den Organen eine zentrale Stellung ein. Aus den Untersuchungen von Ginsburg und Heller [99] und auch anderen [100, 101] ist zu entnehmen, daß

etwa 50% einer intravenös verabreichten Hormonmenge innerhalb von fünf Minuten von diesem Organ aufgenommen werden. Um so überraschender ist bei dieser Verteilung, daß kaum nennenswerte Hormonmengen unmittelbar in der Niere nachgewiesen werden konnten. Heller und Zaidi[95] fanden bei Ratten drei bis fünf Minuten nach einer intravenösen Injektion von 100 mE. V nur 0,26% oder weniger. Da zur gleichen Zeit 3,4% V im Harn bestimmt wurden, folgerten diese Autoren aus ihren Experimenten, daß V sehr rasch in der Niere irreversibel inaktiviert wird. Eine Bestätigung sahen sie in Versuchen an Nierenhomogenat, in denen zugesetztes V ebenfalls nach wenigen Minuten mit den üblichen Methoden nicht mehr nachweisbar war.

Die besondere Aufmerksamkeit in den vorliegenden Untersuchungen galt deshalb dem Hormongehalt in der Niere, dessen genaue Kenntnis notwendig ist, wenn Modellversuche an Mitochondrien eine reale Bewertung für das physiologische Verhalten des V erfahren sollen. Deshalb wurde die Aufnahme des V von der Niere und der Hormongehalt in der Niere erneut bestimmt und dabei eine Versuchsanordnung benutzt, in der Fehlermöglichkeiten von Heller und Zaidi[95] weitgehend ausgeschlossen wurden.

Viele Vorteile vereinigt die Untersuchung an dem von uns gewählten Objekt der isoliert durchströmten Niere: Diese Methode erlaubt exakt zu dosieren, rasch Gewebe zur Analyse zu gewinnen und die Durchströmungsflüssigkeit zu variieren. In dieser Versuchsanordnung ist die Niere ein überlebendes Organ: Eine geeignete Zusammensetzung der Durchströmungsflüssigkeit bei ausreichender O_2-Versorgung gewährleistet einen weitgehend intakten Stoffwechsel. Der Bestimmung des V-Gehaltes im Nierengewebe ging die Reinigung und Extraktion des Hormons voraus. Damit sollte die Spezifität des Nachweises verbessert werden. Die Hormonausbeute in diesem Verfahren ist größer als bei dem Originalverfahren von Bisset und Walker[86] und der Methode von Heller und Zaidi[95]. Als Hormonpräparat diente Tonephin, die antidiuretische Komponente des Hypophysenhinterlappen-Extraktes und Oxypressin, ein synthetisches, dem V analoges Polypeptid. Der zweiten Verbindung fehlen begleitende höhermolekulare Verunreinigungen, die bei der Verwendung von Hypophysenhinterlappen-Extrakt stören können.

In mehreren Durchströmungsversuchen, die in verschieden langem Abstand vom Versuchsbeginn unterbrochen wurden, wurde von uns die renale Aufnahme und der effektive Hormongehalt im Gewebe bestimmt. Die stets steil abfallende Regressionskurve des

O-Gehaltes in der Durchströmungsflüssigkeit zeigt eine schnelle Aufnahme des Hormons an. Die indirekten Schlüsse früherer Untersucher [99, 100] können somit durch direkte Untersuchungen bestätigt werden.

Als Nebenbefund konnte festgestellt werden, daß die renale Aufnahme von mehreren Komponenten beeinflußt wird. Zwei Exponentialkurven bestimmen die Aufnahme. Jede dieser Kurven ist ohne Zweifel die Resultante aus einer Anzahl unabhängiger Prozesse. Allerdings können nur in einem begrenzten Sinne die anschließend mitgeteilten Faktoren als die wichtigsten Determinanten einer Kurve betrachtet werden.

Die langsame Komponente mit einer Halbwertszeit von zwei Minuten und drei Sekunden repräsentiert vor allem die Diffusion von O in das Gewebe und die Bindung durch Gewebsproteine. Es bedarf keiner besonderen Erwähnung, daß die Durchströmungsgröße der Niere diese Komponente beeinflussen kann. Sie wurde in diesen Versuchen deshalb konstant gehalten. Die geringfügige renale Exkretion in den Harn — sie betrug 5,2% der verabreichten Dosis — übt keinen wesentlichen Einfluß aus. Von größerer Bedeutung ist jedoch die Zusammensetzung der Durchströmungsflüssigkeit. In Gegenwart von Blut wird O langsamer als aus einer blutfreien Flüssigkeit aufgenommen. Offenbar wird das Hormon an Blutbestandteile gebunden, wenngleich in einer leicht dissozierenden Form. Eine kleine Fraktion mag frei sein, die im Gleichgewicht mit dem gebundenen Teil steht. Da die schnelle renale Aufnahme eine große Affinität der Nierenzellen zum V anzeigt, wird das Hormon, sobald es von den Blutbestandteilen abdissoziert, von der Niere gebunden. Die Kinetik dieses Prozesses modifiziert den Verlauf der langsamen Exponentialkurve. — Aus der blutfreien Durchströmungsflüssigkeit wird O mit großer Geschwindigkeit aufgenommen (Halbwertszeit: Eine Minute und 33 Sekunden).

Die schnelle Exponentialkurve wird durch den physikalischen Prozeß der Mischung des V in die Durchströmungsflüssigkeit bestimmt. Die Tatsache, daß dieser Effekt nur bei einer späteren Zugabe des Hormons zur Flüssigkeit auftritt, stützt diese Ansicht.

Die meisten Versuche wurden mit Halbblut ausgeführt. Trotzdem kann angenommen werden, daß dabei die Kinetik der Aufnahme den Verhältnissen in vivo ähnlich ist. Dafür spricht die gute Übereinstimmung der Halbwertszeiten bei Verwendung von Halb- und Vollblut. Bemerkenswerterweise verläuft die Regression des

V-Gehaltes im Blute beim Ganztier ähnlich den hier ermittelten Ergebnissen.

Wenn parallel zur Hormonaufnahme durch die Nieren der Gehalt im Organ selbst bestimmt wird, dann läßt sich auch in diesen Versuchen — ähnlich den Beobachtungen von Heller und Zaidi[95] — nur ein Teil der verabreichten Dosis wiederfinden. Der Konzentrationsverlauf zeigt einen Gipfelwert in der dritten Minute und fällt anschließend langsam ab. Der höchste Gehalt nach drei Minuten betrug 14,2%. Oxypressin und Tonephin verhalten sich etwa gleich. Diese Substanzmenge in der Niere wird nicht durch die Polypeptid-Konzentration der Durchströmungsflüssigkeit, die sich in den Nierengefäßen befindet, oder gar durch antidiuretische Substanzen anderer Herkunft vorgetäuscht. Geeignete Vorkehrungen und Kontrollversuche schließen diese Möglichkeit aus. Auch die Flüssigkeit in den ableitenden Harnwegen kommt wegen ihrer geringen Konzentration für diese Hormonmenge nicht in Frage. Ein direkter Beweis für die Lokalisation im Nierengewebe wurde bei der später beschriebenen Fraktionierung der Nierenzellen in subzelluläre Partikel geführt. Dabei konnte O in Mitochondrien und Zellkernen nachgewiesen werden. Die Hormonmengen, die bei diesen Untersuchungen im Nierengewebe angetroffen wurden, übersteigen die Angaben von Heller und Zaidi[95] um das 20- bis 50fache, wenn der Gehalt auf das Nierengewebe bezogen wird. Dieser große Unterschied kann nur zum geringeren Teil durch Hormonverluste beim Extraktions- und Bestimmungsverfahren von Heller und Zaidi[95] erklärt werden. Vielmehr kann angenommen werden, daß die Extraktionsmethode, die in diesen Versuchen benutzt wurde, mehr V und O aus dem Gewebe freisetzt als dies Heller und Zaidi[95] gelungen ist. Um diese Ansicht zu stützen, wurden von uns Parallelbestimmungen mit dem Verfahren von Heller und Zaidi[95] ausgeführt. Sie ergaben tatsächlich wesentlich niedrigere Resultate. Anderseits gelang es bisher noch nicht, das eigene Extraktionsverfahren zu noch größerer Ausbeute zu steigern, um vielleicht Kenntnisse über die gesamte von der Niere aufgenommene Hormonmenge zu erhalten.

Der Verbleib antidiuretischer Polypeptide in der Niere ist für Kenntnisse über den Wirkungsmechanismus von großer Bedeutung. Wenn die Annahme von Heller und Zaidi[95] berechtigt ist, daß V in kurzer Zeit inaktiviert wird, dann ergibt sich die Frage: Wie die bekannte langdauernde Antidiurese in der Niere zustande kommt. Eine maximale Antidiurese kann 20—60 Minuten und auch länger

dauern. Zwei Antworten können zur Diskussion gestellt werden: 1. Nicht nachweisbare kleinste Hormondosen sind wirksam. Bei der Empfindlichkeit der üblichen Methoden müßte diese Konzentration unter 10^{-5}—10^{-6} E. pro Gramm Nierengewebe liegen. 2. Die großen Hormonmengen, die von der Niere in wenigen Minuten aufgenommen werden, führen zu Veränderungen der Nierenzellen, die nach der Inaktivierung des V fortbestehen. Die Wirkung des V wäre dann als allobiotisch im Sinne der von Heubner [103] gegebenen Definition aufzulassen, d. h. die Wirkung besteht noch zu einem Zeitpunkt, an dem am Wirkungsort praktisch mit keiner Hormonkonzentration mehr zu rechnen ist.

Es scheint uns jedoch aus den Gehaltsbestimmungen von Heller und Zaidi [95] nicht berechtigt zu sein, ausschließlich eine rasche irreversible Inaktivierung des antidiuretischen Hormons anzunehmen, zumal wenn man bedenkt, daß noch keine Abbauprodukte des V nachgewiesen worden sind. Aus den vorliegenden Untersuchungen und auch aus älteren Vermutungen [103] muß eine weitere Möglichkeit berücksichtigt werden, die sich analytisch als Hormoninaktivierung zeigen kann. Das Hormon könnte sich durch eine feste Bindung an das Nierengewebe dem Nachweis mit den bekannten Extraktions- und Bestimmungsverfahren entziehen. Die Inaktivierung könnte später — wesentlich langsamer — erfolgen. Zu dieser Hypothese veranlassen uns vor allem die Extraktionsergebnisse aus Nierengewebe mit dem hier angegebenen Verfahren und der Methode von Heller und Zaidi [95]. Mit dem ersten Verfahren konnte ein mehrfach höherer Gehalt gemessen werden als mit dem zweiten, das zur Inaktivierungshypothese von Heller und Zaidi [95] Anlaß gab. — Es wäre allerdings auch denkbar, daß ein Teil des Hormons beim Extrahieren zerstört wird, vor allem wenn das Polypeptid an Gewebsbestandteile fest gebunden ist und nur durch energische chemische Maßnahmen abgetrennt werden kann. Partielle oder vollständige Zerstörung des Moleküls bei der Lösung aus seiner Gewebsbindung entzieht sich den üblichen Kontrollbestimmungen mit zugesetztem Hormon. Bemerkenswert sind in diesem Zusammenhang auch die Beziehungen des Hormongehaltes zur O-Wirkung bei der Mitochondrienschwellung. Dabei läßt sich — nach einer ähnlichen Regression des Hormongehaltes wie im Plasma und in der Durchströmungsflüssigkeit — nach wenigen Minuten kein O im Versuchsansatz mehr nachweisen, obgleich die Wirkung fortbesteht. Diese Untersuchung an Mitochondrien schließt wenigstens für diese Versuchsanordnung mit großer Wahrscheinlichkeit aus, daß kleinste

Hormonmengen für die Wirkung verantwortlich sind. In diesem Fall müßte eine Parallelität zwischen O-Konzentration und Hormonwirkung — mit einem anfangs sehr starken Effekt — zu beobachten sein.

Antidiuretische Polypeptide diffundieren in das Nierengewebe und werden von Gewebsbestandteilen gebunden. Die Frage, ob diese Stoffe in die Zelle eindringen und sich gar in subzellulären Partikeln anreichern, wurde durch Hormonbestimmungen in Zellfraktionen zu entscheiden versucht. In diesen Experimenten wurde der prozentual höchste Hormongehalt in der bei der Präparation überstehenden Flüssigkeit — die vornehmlich aus Zytoplasma und Mikrosomen besteht — angetroffen. Wesentlich geringer ist die Konzentration in der Mitochondrien-Fraktion, am geringsten in der Kern-Fraktion. Gegen diese intrazelluläre Verteilung könnte eingewendet werden, daß sie sich erst während der verhältnismäßig langen Präparation der Zellfraktionen eingestellt hat. Um diese Möglichkeit zu entkräften, wurden Kreuzversuche vorgenommen, in denen eine O-haltige Zytoplasma-Mikrosomen-Fraktion mit O-freien Mitochondrien und Zellkernen gemischt wurde. Anschließend wurden die Partikel erneut fraktioniert. Bei einem künstlichen Verteilungsgleichgewicht des O zwischen den Zellbestandteilen müßte eine hohe Hormonkonzentration in den Mitochondrien und Zellkernen angetroffen werden. Tatsächlich war der Gehalt jedoch geringfügig. Dies kann als ein Hinweis angesehen werden, daß die Verteilung bereits intrazellulär eingetreten ist. Aus dem Kreuzversuch ist fernerhin zu entnehmen, daß O fest an Zellbestandteile gebunden ist. Bei einer leicht dissoziierenden Bindung wäre eine annähernd gleichmäßige Verteilung zu erwarten gewesen.

Obgleich die Verteilung des Hormons auf die Zellfraktionen regelmäßig und gut übereinstimmend beobachtet werden konnte, so muß bei der quantitativen Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden, daß geringe Verschiebungen der O-Konzentrationen in den Zellfraktionen durch die starke Verdünnung der Komponenten und die Schädigung der Partikel während der Präparation eintreten können.

In diesen Untersuchungen konnte kein Hinweis für oder gegen die Möglichkeit gefunden werden, daß die zelluläre Aufnahme und Verteilung der Polypeptide ein aktiver Prozeß ist.

Nachdem festgestellt wurde, daß Mitochondrien in vivo antidiuretisches Hormon enthalten können, gewinnen Versuche an diesen Partikeln zusätzliche Bedeutung über Modellstudien hinaus. Die Be-

ziehungen einiger fundamentaler Funktionen der Mitochondrien zu antidiuretischen Polypeptiden soll in den folgenden Abschnitten betrachtet werden.

Es ist seit längerer Zeit bekannt [130], daß Mitochondrien aus verschiedenen Geweben — vor allem der Leber — in hypotonischen Nichtelektrolytlösungen schwellen, bis ihr Volumen ein Mehrfaches der ursprünglichen Größe beträgt. Dabei werden die kompakten, granulären, phasenkontrastmikroskopisch undurchsichtigen Mitochondrien zu blasigen transparenten Gebilden, bei denen Reste der ursprünglichen Struktur mondsichelartig am Rande sitzen. Die Mitochondrien verhalten sich dabei wie ein vollkommenes Osmometer und folgen dem Boyle-Van't-Hoffschen Gesetz (PV = const), wenn man folgende Tatsache in Rechnung setzt, daß die Mitochondrien einen „toten Raum" b enthalten, der mit osmotisch inerten Substanzen wie Lipoiden und Eiweiß gefüllt wird. Diese Stoffe bilden möglicherweise eine Art Stroma, während der Rest V-b das osmotisch verschiebliche freie Wasser enthält. Mit anderen Worten: Die Mitochondrien folgen der Beziehung P (V-b) = const.

Ein osmometerähnliches Verhalten der Mitochondrien kann auch in der Zelle elektronenmikroskopisch beobachtet werden [105]. Allerdings ist dieser Prozeß dort bei intaktem Stoffwechsel vollständig reversibel, im Gegensatz zur begrenzten Umkehr in vitro. Die elektronenmikroskopischen Ergebnisse lassen als Ursache der Schwellung zwei aufeinanderfolgende Membranen an der Peripherie der Mitochondrien erkennen. Diese Struktur ist wahrscheinlich zugleich für den hohen Gehalt der Mitochondrien an löslichen Proteinen — einschließlich Enzymen — und niedermolekularen Stoffen verantwortlich [106]. Diese Barriere, die den Stoffaustausch reguliert, ist offenbar der Zellmembran sehr verwandt [107].

Die Schwellung der Nierenmitochondrien in hypotonischen Rohrzuckerlösungen, die in den vorliegenden Versuchen beobachtet wurde, zeigt, daß sich diese Partikel ähnlich wie Mitochondrien aus der Leber oder anderen Organen [97] verhalten. Die Volumenzunahme beginnt etwa bei einem Rohrzuckergehalt von 0,4 m und steigt dann steil an bis zu einer Verdünnung von 0,1 m. Die Übereinstimmung besonders mit Lebermitochondrien ist auch hier recht groß [103]. Ebenso ist die Reversibilität dieses Vorganges verwandt. Eine partielle Umkehr kann nur in den ersten drei bis fünf Minuten beobachtet werden, später ist die Volumenzunahme irreversibel. Daß sich blasig dilatierte Mitochondrien nach einiger Zeit nicht mehr retrahieren — wenn die hypotonische Lösung mit einer isotonischen wieder vertauscht

wird — ist nicht weiter verwunderlich, wenn man bedenkt, daß bei der Schwellung von Lebermitochondrien der Austritt von Adenosintriphosphatasen, Coenzymen und anderen Co-Faktoren für den Zellstoffwechsel beschrieben worden ist [97, 108]. Offenbar verlieren diese Organellen beim Verlust dieser Stoffe die Fähigkeiten zu einer geordneten Funktion. Aus diesen Untersuchungen geht das quantitative Verhältnis zwischen Wasseraufnahme und Kalium-, Natrium- und ATP-Verlust hervor.

Werden Mitochondrien mit O — oder auch Tonephin — vorbehandelt und anschließend einem anisotonischen Milieu ausgesetzt, dann bleibt die Schwellung ganz oder teilweise aus. Diese Permeabilitätsabnahme für Wasser ist dabei nicht Teil einer allgemeinen Abdichtung der Mitochondrien. Vielmehr ist sie selektiv und erstreckt sich nicht auf Kalium und Natrium. Beide Metallionen diffundieren in unveränderter Menge in die Suspensionsflüssigkeit.

Wichtig ist die Frage, ob aus den Ergebnissen Schlüsse auf die Natur der Polypeptidwirkung gezogen werden können. Ursprünglich stellten wir uns die Hormonwirkung als einen aktiven Prozeß vor, der selektiv die hypothetische „Wasserpumpe" leistungsfähig hält, in folgendem Sinne etwa: Das Innere der Mitochondrien ist durch ein Donnangleichgewicht (bedingt durch fixe negative Ladungen der Mitochondrien) hypertonisch. Wasser hat also die Tendenz, in die Mitochondrien einzuströmen. Ein energieverbrauchender Mechanismus arbeitet dem ständig entgegen. Bei der osmotischen Schwellung ist diese „Wasserpumpe" nicht fähig, das größerwerdende Konzentrationsgefälle aufzuhalten. Durch antidiuretische Polypeptide könnte diese „Wasserpumpe" aktiviert und unter Energieverbrauch das Partikelvolumen trotz eines großen osmotischen Gradienten aufrechterhalten werden.

Die genauere Analyse der Ereignisse bei der Hormonwirkung widerspricht dieser Vorstellung. Es interessiert dabei besonders das Verhalten des höher phosphorylierten Adeninnukleotids ATP, dessen Bedeutung für verschiedene Schwellungsformen vielfach hervorgehoben worden ist [97, 103, 109]. ATP wird allgemein als notwendiger Co-Faktor der meisten Stoffwechselfunktionen isolierter Mitochondrien angesehen und verhindert bzw. verzögert tatsächlich auch einige Schwellungsformen. Diese Eigenschaft ist die Ursache dafür, daß ATP zur Erhaltung von isolierten Mitochondrien bei In-Vitro-Versuchen zugesetzt werden muß, obschon es für viele Teilreaktionen im Mitochondrienstoffwechsel nicht direkt als Phosphatdonator benötigt wird. Es wirkt dabei in übergeordneter Weise, indem es die

kompakte Struktur der Zellgranula bewahrt. Vermutlich spielt die Bindung von Metallionen [97], z. B. Ca^{++}, eine große Rolle.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß ATP für die Wirkung antidiuretischer Polypeptide offenbar nicht von entscheidender Bedeutung ist. In der Mitochondriensuspension wurden Bilanzversuche angestellt, in denen dem Verbleib des Polyphosphates nachgegangen wurde. Dabei wurde festgestellt, daß unter O ATP nicht in den Mengen in Mitochondrien gefunden werden konnte, die den normalerweise strukturerhaltenden Konzentrationen entsprechen. Man könnte nun vermuten, daß ATP zur Erhaltung der Struktur „verbraucht" worden sei. Dafür ließen sich keine sicheren Hinweise erhalten. Vielmehr wurde ein erheblicher Teil der ATP in den ersten Minuten nach Versuchsbeginn in der Suspensionslösung gefunden, was nur durch Diffusion aus den Mitochondrien möglich ist.

Allerdings können ATP-Konzentrationen, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in den Mitochondrien gemessen worden sind, höchstens Aussagen über den Zustand des Gleichgewichtes zwischen Synthese und Abbau ermöglichen, Rückschlüsse über Funktionsstörungen lassen sie nicht zu, weil für deren Beurteilung ganz überwiegend die Feststellung der Geschwindigkeit des Phosphatumsatzes in der Nukleotidfraktion notwendig ist. Die Verhältnisse liegen etwas günstiger, wenn neben der stationären ATP-Konzentration als Maß für die Stoffwechselaktivität die Atmung bekannt ist. Darüber liegen am Nierengewebe mehrere Untersuchungen vor [110]: Ihnen ist gemeinsam, daß die Atmung durch antidiuretische Polypeptide entweder unverändert oder gar herabgesetzt ist. Auf Grund der ATP-Verschiebung aus den Mitochondrien in die Suspensionsflüssigkeit und den eben genannten Atmungsversuchen neigen wir deshalb dazu, daß unter O der Umsatz des energiereichen Phosphates nicht vermehrt ist.

Es erhebt sich nun die Frage, auf welche Weise antidiuretische Polypeptide die Mitochondrienstruktur vor ungehemmter osmotischer Wasseraufnahme bewahren. Die Mitochondrien sind sicher nicht Gebilde, die lediglich von einer äußeren Hülle eingeschlossen gelöste Enzyme und Nukleoproteide enthalten. Auf die elektronenoptische Ultrafeinstruktur der Mitochondrien wurde bereits hingewiesen [106, 111]. Auch die chemischen Analysen, die Exer [112] durchgeführt hat, ergeben die komplexe Struktur der Mitochondrien, in dem sämtliche Baustoffe des Protoplasmas sich auch in den Partikeln vorfinden. Mitochondrien stellen morphologisch, funktionell und chemisch hochdifferenzierte Zellorganismen dar. So ist es eigentlich nicht ver-

wunderlich, daß der Hormoneffekt nur kurzzeitig auslösbar ist. Spätestens nach 60 Minuten kann die osmotische Schwellung nicht mehr aufgehalten werden, obgleich die Partikel noch nicht maximal geschwollen sind. Diese große Empfindlichkeit der Reaktion legt den Gedanken nahe, daß bei der Alterung der Organellen offenbar Stoffe abgebaut werden oder anderweitig verloren gehen, die zur Polypeptidwirkung notwendig sind. Große Ähnlichkeit besitzt dieser Vorgang mit dem Abfall der Atmung durch Alterung der Mitochondrien. Als Ursache dafür wird angenommen, daß wichtige Co-Faktoren in die Suspensionsflüssigkeit diffundieren. Für den Verlust einzelner Co-Enzyme konnte der Nachweis geführt werden [108]. — Diese Abhängigkeit der Hormonwirkung vom Alter der Mitochondrien läßt sich anderseits sehr schwer mit der Möglichkeit vereinbaren, daß vielleicht Schrumpfungsprozesse — in der Art von Eiweißdenaturierungen — Ursache der Volumenstabilität sein könnten. Dagegen spricht auch, daß die Polypeptidhemmung nur nach Vorbehandlung der Mitochondrien zu beobachten ist. Einfache Schrumpfungsprozesse sollten auch an geschwollenen Mitochondrien noch auslösbar sein.

Vielleicht handelt es sich jedoch bei der Polypeptidwirkung um Prozesse, die an den von Raaflaub [97] und Davies [109] vermuteten kontraktilen und auch dilatationsfähigen Strukturelementen in den Mitochondrien angreifen. Ein Vergleich mit dem trotz enormen Arbeitsaufwands immer noch ungelösten Problem der Kontraktion der glatten Muskelzelle durch z. B. muskulotrope Pharmaka drängt sich auf. In beiden Vorgängen ist die Stellung der ATP unsicher. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß durch hohe Polypeptidmengen Mitochondrien über das Normalvolumen hinaus retrahiert oder vielleicht kontrahiert (?) werden können.

Bei der Hemmung der osmotischen Schwellung durch antidiuretische Polypeptide ist es nicht gleichgültig, welchen osmotischen Druck die Suspensionsflüssigkeit hat. Vielmehr ist eine gesetzmäßige Abhängigkeit zu beobachten. Bei niedrigem osmotischen Druck — also einem hohen Konzentrationsgradienten zwischen Mitochondrien und Rohrzuckerlösung — ist die Hormonwirkung wesentlich geringer als bei einem höheren Druck. Die Ursache dafür ist unbekannt. Vermutlich ist die Empfindlichkeitsabnahme mit dem steigenden Verlust von Co-Faktoren aus den Mitochondrien verbunden, wenn die Suspensionsflüssigkeit verdünnt wird. Es wäre aber auch denkbar, daß die Bindung antidiuretischer Polypeptide an Mitochondrienstrukturen eine Funktion des osmotischen Druckes ist.

Die osmotische Schwellung der Mitochondrien kann durch kleinste Polypeptidmengen gehemmt werden ($< 10^{-4}$—10^{-5} E./ml Mitochondrienansatz): Eine einfache Rechnung zeigt, daß diese Konzentration den Hormonmengen in der Niere recht nahe liegen. Eine maximale Antidiurese bei der Ratte wird durch 2×10^{-4} E./100 g ausgelöst. Wenn etwa 50% der verabreichten Dosis [99–101] von den Nieren absorbiert werden, dann beträgt die renale Aufnahme etwa 5×10^{-5} E./g Niere. Die effektive Konzentration im Gewebe kann dabei unberücksichtigt bleiben, da in beiden Fällen in vivo — in der Niere — und im Mitochondrienversuch „Maskierung" oder „Inaktivierung" der Polypeptide eintritt.

Die große Empfindlichkeit der Mitochondrien für antidiuretische Polypeptide gewinnt noch mehr an Bedeutung, wenn berücksichtigt wird, daß die osmotische Schwellung nur der manifeste Teil einer Schädigung der Mitochondrienstruktur ist. Voraus geht nach den derzeitigen Kenntnissen die Diffusion der ATP [98] in die Suspensionsflüssigkeit, die sicher strukturelle Änderungen als Ursache hat. In Abb. 15 a konnte dargestellt werden, daß die Polypeptidwirkung mit abnehmender osmotischer Belastung ansteigt. Die Kurve fällt dann steil ab, wofür jedoch das Verschwinden der Testgröße — der Schwellung — verantwortlich ist. Wenn es sich bewahrheiten sollte, daß auch in der latenten Phase der osmotischen Schädigung antidiuretische Polypeptide wirksam sind, dann besitzen die Mitochondrien ein außerordentlich aktives Prinzip gegen die ungehemmte Wasseraufnahme durch osmotische Schädigungen.

Von besonderem Interesse mag es sein, ob in diesem Stadium der Erkenntnisse bereits Rückschlüsse auf das Geschehen in der Niere möglich sind. Im Mittelpunkt der Betrachtung steht die Wasserpermeabilität, während sich Alkaliionen und ATP den Milieuänderungen durch die anisotonische Lösung weitgehend anpassen. Wenn man es wagt, die sekretorischen Verhältnisse der Mitochondrien auf die Zelle zu übertragen, wofür nach Bartley und Davies [107] eine gewisse Berechtigung besteht, dann ergibt sich die Frage, ob im tubulären System der Niere Verhältnisse zu erwarten sind, in denen eine osmotische Belastung der Zellen eintritt.

Hier sind die bekannten Versuche von Wirz, Hageday und Kuhn [47–51] am Gegenstrommodell — ergänzt durch Harnanalysen aus einigen Nephronabschnitten — zur Deutung der Harnkonzentrierung erwähnenswert. Diese Autoren kommen zu der Auffassung, daß Nephron, Sammelröhren und Blutgefäße während ihres Verlaufs von den kordikalen Gefäßgebieten der Niere bis in die Spitze der

Nierenpapille in einem Gebiet mit starker osmotischer Differenz liegen. Gegen die Papillenspitze zu wird das Milieu immer stärker hypertonisch und dieses hypertonische Milieu wird von den harnführenden Sammelröhren durchschritten. Durch die Schlängelung der Tubuli und der Blutgefäße wird ein hoher osmotischer Gradient zwischen den Sammelröhren und dem Gewebe erreicht. Der Harn gelangt hypotonisch in die distalen Tubulusabschnitte, nachdem Kochsalz aktiv zurückresorbiert wurde und osmotisch freies Wasser zurückläßt. Nach W i r z genügt dann in den distalen Abschnitten eine semipermeable Membran, durch welche das Wasser, dem osmotischen Gradienten folgend, ins Interstitium und in die Blutgefäße wandert, so daß schließlich der Inhalt der Sammelröhren konzentriert ist. V müßte dann auf die epitheliale Grenzmembran der distalen Tubuluszellen einwirken und die passive Wasserdiffusion steigern. Ohne V wäre die Membran praktisch verschlossen.

Diese moderne Anschauung über die Konzentrierung des Harns hat einen erheblichen osmotischen Gradienten zwischen Harn und Gewebe zum Inhalt. Wenn dabei eine geringfügige Schwellung der Epithelien eintritt, dann wäre es denkbar, daß hypothetische Poren, die durch die epitheliale Grenzmembran ins Interstitium führen, verschlossen werden. Unter V würde die Schwellungshemmung der Zellen trotz osmotischer Belastung die Poren offen halten.

Anschließend mag erwähnt sein, daß eine ähnliche Porenöffnung durch V neuerdings von U s s i n g [113] bei der Wasseraufnahme durch die Amphibienhaut vermutet wird. Diese Vorstellungen sind hypothetischer Natur. Sie könnten sich bewahrheiten, wenn es gelingt, die vorliegenden Ergebnisse experimentell am Tubulusepithel zu prüfen.

Schlußbetrachtungen

Für antidiuretische Polypeptide fehlen bislang genauere Kenntnisse über den Wirkungsort in den ableitenden Harnwegen und über den grundsätzlichen zellulären Wirkungsmechanismus. Zu dem zweiten Problem sollen diese Untersuchungen ein Beitrag sein. Unsere Ergebnisse lassen sich zu folgendem Bild über die Ereignisse, die zur Antidiurese in der Niere führen, zusammenfassen:

Antidiuretische Polypeptide sind bei der Durchströmung der Niere an Blutbestandteile fixiert. Die Bindung ist ausreichend dissoziationsfähig, um den hormonaffinen Zellen der Niere eine schnelle Aufnahme zu ermöglichen. Mit einer Halbwertszeit von etwa zwei

Minuten werden verhältnismäßig große Polypeptidmengen vom Nierengewebe aufgenommen. Diese Beobachtungen wurden an der überlebenden isolierten Niere gewonnen, die viele methodische Vorteile vor dem Ganztier besitzt. Die rasche Hormonaufnahme von der Niere steht in gutem Einklang mit der Plasmaregression von V in vivo.

Die antidiuretischen Stoffe werden von der Niere festgehalten und nur in geringer Menge in den Harn ausgeschieden. Die Bindung an Zellbestandteile scheint anfangs locker zu sein — parallel dazu erfolgt die Harnausscheidung — später aber sehr stabil. In diesem Zustand können antidiuretische Polypeptide mit den üblichen Extraktionsverfahren nicht mehr erfaßt werden. Vielleicht werden diese Stoffe in Nierenproteine eingebaut. Für eine chemische Bindung spricht die Temperaturabhängigkeit dieses Prozesses: Bei niedrigen Temperaturen wird die feste Bindung verzögert.

Bisher wurde vermutet, daß V sehr schnell in der Niere inaktiviert wird, obgleich weder Spaltprodukte bekanntgeworden sind, noch andere sichere Zeichen vorliegen. Für eine feste Bindung — in der V als ein fremder polypeptidischer Bestandteil der Gewebsproteine zu betrachten ist — sprechen die Extraktionsversuche und die Beziehungen zwischen Wirkung und nachweisbarem Hormongehalt in der Niere.

Besonders eindrucksvoll sind in diesem Zusammenhang die Gehaltsbestimmungen in Mitochondrienversuchen.

Antidiuretische Polypeptide dringen in das Zellinnere ein und werden von verschiedenen Zellkomponenten gebunden. Auch dabei kann eine feste Bindung beobachtet werden, die bei niedrigen Temperaturen offenbar durch träge ablaufende chemische Prozesse verzögert wird. Der höchste Gehalt reichert sich in der Zytoplasma-Mikrosomen-Fraktion an, der niedrigste in den Zellkernen. Die Mitochondrien nehmen eine Mittelstellung ein.

Der intravitale Hormongehalt in Mitochondrien rückt diese Partikel unmittelbar in den Bereich der von antidiuretischen Polypeptiden betroffenen Zellbestandteile. Besonderes Gewicht erhalten Kenntnisse über die Beziehungen dieser Partikel zu antidiuretischen Polypeptiden durch die Monopolstellung der Mitochondrien in einigen Zellfunktionen. Andere Eigenschaften sind denen der intakten Zelle sehr ähnlich, z. B. die Permeabilitätsverhältnisse.

In der Niere können wahrscheinlich erhebliche osmotische Gradienten — vor allem zwischen den distalen Teilen der ableitenden Harnwege und dem papillären Nierengewebe — entstehen. Dort wird

auch die V-Wirkung vermutet. Unsere Versuchsanordnung kommt diesen Verhältnissen entgegen. Antidiuretische Polypeptide wurden an osmotisch belasteten Nierenmitochondrien geprüft.

O und V hemmen in diesen Versuchen die Wasseraufnahme und damit die Volumenveränderung (Schwellung) der Partikel in hypotonischen Suspensionslösungen. Die Schutzwirkung gegen anisotonische Schädigung ist dabei offenbar selektiv und in unseren Versuchen auf Wasser begrenzt. Die rasche Diffusion von K^+ und Na^+ aus schwellenden Mitochondrien in die Suspensionsflüssigkeit wird z. B. nicht aufgehalten. Diese unbehinderte Diffusion von K^+ und Na^+ verringert die osmotische Belastung der Mitochondrien und schützt sie vermutlich vor osmotischen Schädigungen.

Es kann vermutet werden, daß die O-Wirkung kein aktiver, energieverbrauchender Prozeß ist. Bereits in älteren Untersuchungen wurde auf einen normalen oder gar verringerten Sauerstoffverbrauch unter V hingewiesen. Wir konnten zeigen, daß ATP — das wichtigste bekannte Intermediärprodukt des Energiestoffwechsels — während der Schwellungshemmung durch antidiuretische Polypeptide aus den Mitochondrien in die Suspensionsflüssigkeit diffundiert. Es könnte allerdings möglich sein, daß die unbehinderte ATP-Abgabe von Vorteil für die Funktion der übrigen Zelle wäre.

Nierenmitochondrien sind gegen die form- und strukturerhaltenden Eigenschaften antidiuretischer Polypeptide sehr empfindlich. Die quantitativen Ergebnisse dieser Untersuchungen rechtfertigen die Annahme, daß Mitochondrien auch in vivo gegen osmotische Schädigung geschützt werden. Darüber hinaus ist diese Annahme auch für die komplette Zelle naheliegend: Auf die sekretorischen Ähnlichkeiten beider Organismen wurde mehrfach hingewiesen. Eine wichtige Stütze dafür ist der wesentlich höhere Hormongehalt in der Zytoplasma-Mikrosomen-Fraktion (im Vergleich mit Mitochondrien). Diese Komponente enthält wahrscheinlich die Hormonmengen, die sich in der Zellgrenzfläche anreichern.

Welche Bedeutung kann diese Hormonwirkung für die Antidiurese haben? Ähnlich Mitochondrien werden die Tubulusepithelien, wenn sie einem osmotischen Gradienten ausgesetzt sind, mehr oder weniger schwellen. Dabei können Wasserwege (Poren?) in das osmotisch aktive Interstitium und in die Blutgefäße verlegt werden. Dieser Zustand kann in der Niere beim Fehlen von V, z. B. beim Diabetes insipidus, erwartet werden: $^1/_8$ des Harnfiltrates (etwa 13% von 180—200 Litern) wird dann als hypotonischer Endharn ausgeschieden. Nach einer V-Ausschüttung unterbleibt die Schwellung

der Zellen und die Verlegung der hypothetischen Wasserwege. Das osmotisch freie Wasser der Harnwege diffundiert in Richtung des Konzentrationsgradienten in das Interstitum, bis schließlich der Endharn mit dem Papillengewebe isotonisch ist. Diese Vorstellungen können im Schema Abb. 17 zusammengefaßt werden:

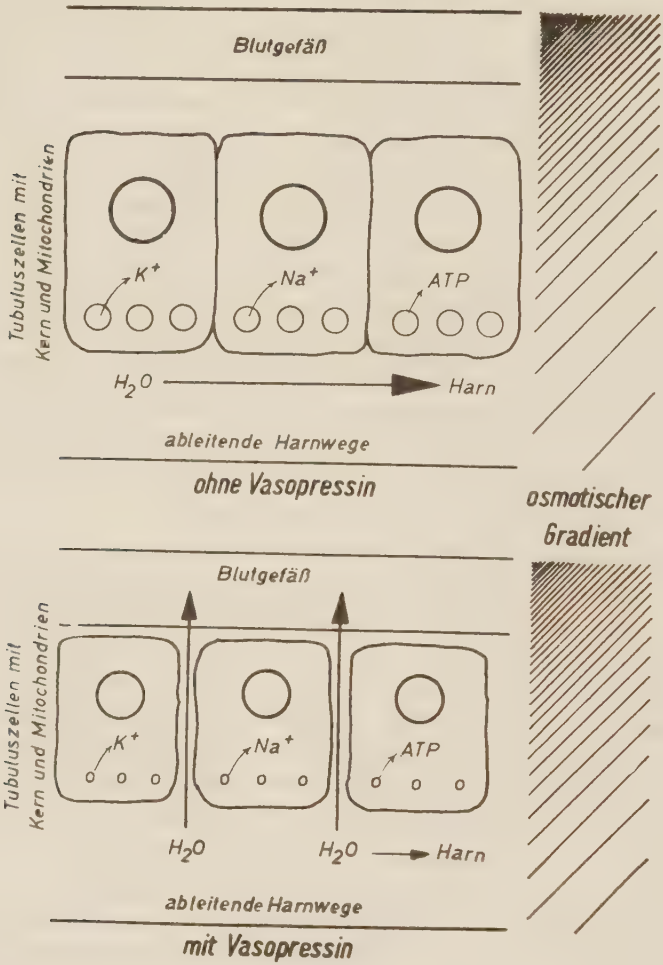


Abb. 17

Zusammenfassung

A. An der isolierten überlebenden Niere wurde die Aufnahme und Verteilung von antidiuretischen Polypeptiden (Vasopressin und Oxypressin) untersucht.

1. Beide Stoffe werden schnell aus der Durchströmungsflüssigkeit von der Niere aufgenommen. Von Bedeutung ist dabei neben

der Affinität des Nierengewebes die Zusammensetzung der Durchströmungsflüssigkeit. Mit Vollblut als Durchströmungsflüssigkeit ist die Halbwertszeit länger als mit einer wässerigen Elektrolytlösung. Aus den unterschiedlichen Halbwertszeiten wird eine Bindung antidiuretischer Polypeptide an Blutbestandteile angenommen.

2. Die Ausscheidung der Stoffe mit dem Harn ist sehr gering. Sie betrug in diesen Versuchen 5,2% der verabreichten Dosis. In der Niere selbst wird nur ein Teil der aufgenommenen Polypeptidmenge wiedergefunden. Nach drei Minuten kann ein Maximum mit 14% der verabreichten Dosis beobachtet werden. Mit verschiedenartigen Extraktionsverfahren wurden unterschiedliche Hormonmengen in der Niere erfaßt. Aus diesen Beobachtungen kann man annehmen, daß die Polypeptide anfangs locker und später fest an die Nierenzellen gebunden sind. Nur in der ersten Phase sind die Stoffe mit den üblichen Verfahren nachzuweisen.

3. Antidiuretische Polypeptide dringen in Nierenzellen ein und werden von verschiedenen Zellkomponenten angereichert. Der höchste Gehalt konnte in der Zytoplasma-Mikrosomen-Fraktion gemessen werden, der niedrigste in der Zellkern-Fraktion. Die Mitochondrien nehmen eine Mittelstellung ein. Intrazelluläre Partikel rücken damit in den Bereich der Zellbestandteile, die unmittelbar von antidiuretischen Polypeptiden betroffen werden.

B. In weiteren Untersuchungen wurde der Einfluß von Vasopressin und Oxypressin auf die Permeabilitätsverhältnisse von Mitochondrien geprüft. Als Versuchspräparate dienten osmotisch belastete isolierte Nierenmitochondrien.

1. Die osmotische Schwellung dieser Partikel wird durch antidiuretische Polypeptide gehemmt. Bereits 10^{-5} E./ml Mitochondrienansatz sind wirksam. Das Ausmaß der Hemmung entspricht etwa der antidiuretischen Aktivität der Stoffe. In hohen Konzentrationen lösen beide Polypeptide eine Retraktion der Mitochondrien aus. Die Schwellungshemmung kann im Phasenkontrastmikroskop beobachtet werden.

2. Die Hemmbarkeit der osmotischen Schwellung geht mit der Alterung der Mitochondrien verloren. Diese Besonderheit schließt einen einfachen physikalisch-chemischen Prozeß als Ursache der Hormonwirkung aus. Wahrscheinlich sind dafür Co-Faktoren erforderlich, die bei der Alterung langsam aus den Mitochondrien diffundieren.

3. Die hemmenden Eigenschaften antidiuretischer Polypeptide sind weitgehend selektiv. Während die Wasseraufnahme gebremst

wird, ändert sich die Diffusion von Kalium, Natrium und Adenosintriphosphorsäure nicht oder nur geringfügig.

4. Während der Schwellungshemmung ist der Adenosintriphosphorsäure-Gehalt in den Mitochondrien niedriger als in normalen Partikeln. Ein großer Teil des Polyphosphats ist in die Suspensionslösung diffundiert. Unter Berücksichtigung älterer Untersuchungen über den Sauerstoffverbrauch des Nierengewebes nach Vasopressin-Verabreichung wird angenommen, daß die Wirkung antidiuretischer Polypeptide kein Prozeß mit Energieverbrauch ist.

Aus der Wirkung von Vasopressin und Oxypressin auf osmotisch geschädigte Mitochondrien und der quantitativen Verteilung dieser Stoffe in der Niere wird eine Deutung der tubulären Antidiurese versucht.

C. Für diese Untersuchungen wurde eine biologische Methode zur Bestimmung antidiuretischer Polypeptide ausgearbeitet. Als Testgröße wird die Antidiurese von Ratten benutzt. Die Tiere werden — zum Unterschied von bisherigen Verfahren — operativ so vorbereitet, daß die Bestimmung nahezu unbemerkt erfolgen kann. Die Tiere erhalten Polyäthylenkatheter in die Aorta — vor dem Abgang der Nierenarterien — und in beide Ureteren. Störungen der Antidiurese, z. B. durch psychische Stimulierung, können damit weitgehend vermieden werden. Fernerhin besitzt diese Methode den Vorteil, daß die operierten Tiere über Wochen — in einigen Fällen über Monate — verwendbar sind. Die Bestimmung kann damit — bei geringem Arbeitsaufwand — an Tieren mit bekannter Reaktionsweise vorgenommen werden.

Summary

1. The absorption, excretion, and distribution of antidiuretic polypeptides (vasopressin and oxypressin) was studied in the isolated surviving kidney. Both substances are rapidly absorbed by the kidney and are excreted only in small concentrations in the urine. Only a portion of the quantity of polypeptide absorbed can be recovered in the kidney itself. The chief reason for this may well be that the polypeptides are firmly bound to the renal tissues, from which they cannot be freed by the usual methods of extraction, rather than the fact that they are rapidly inactivated.

Antidiuretic polypeptides penetrate into the renal cells, where they are then bound by various cellular components. The highest content was measured in the cytoplasmic microsome fraction, and

the lowest in the nuclear fraction. The content of the mitochondrial fraction figures mid-way between the two.

2. Further studies were carried out to determine the influence of vasopressin and oxypressin on mitochondrial permeability. The material employed consisted of osmotically loaded renal mitochondria. Osmotic inflation of these particles is inhibited by adding small quantities of antidiuretic polypeptide. As the mitochondria age, however, the osmotic inflation ceases to respond in this way. The effect of the polypeptides is probably in this instance dependent upon the presence of certain structures or co-factors which, as the mitochondria become older, are destroyed or diffuse out of the mitochondria.

The inhibitory action of antidiuretic polypeptides on osmotic inflation is largely selective. Whereas the water uptake is reduced, little or no change occurs in the diffusion of potassium, sodium, and adenosine-5′-triphosphoric acid.

3. A biological method for determining antidiuretic polypeptides is described, based on a test in which antidiuresis is measured in the rat. In contrast to techniques previously employed, the animals are surgically prepared in such a way that the determinations can be carried out almost unnoticed by the animal. This makes for much greater sensitivity and accuracy when measuring the effect of antidiuretic polypeptides.

Résumé

1. Etude de l'absorption, de l'excrétion et de la répartition des polypeptides antidiurétiques (Vasopressine, Ocytocine) dans le rein isolé en survie. Les deux substances sont rapidement absorbées par les reins. L'excrétion urinaire est minime. Dans le rein lui-même, on ne retrouve qu'une partie de la quantité des polypeptides absorbées. La cause semble devoir être cherchée bien plus dans une fixation des polypeptides au tissu rénal — liaison qui ne peut être libérée par les procédés d'extraction habituels — que dans une inactivation rapide de ces polypeptides.

Les polypeptides antidiurétiques pénètrent dans les cellules rénales et sont fixés par divers «composants» cellulaires. Le taux maximum peut être mesuré dans la fraction microsomique du cytoplasme, le taux minimum dans la fraction nucléaire. La fraction mitochondriale occupe une position intermédiaire.

2. Dans d'autres recherches, on étudia l'effet de la vasopressine et de l'ocytocine sur les conditions de perméabilité des mitochondries.

Des mitochondries rénales osmotiquement chargées servirent de produits d'essai. Le gonflement osmotique de ces particules est inhibé par l'adjonction de faibles quantités de polypeptides antidiurétiques. Cet effet inhibiteur se perd avec le vieillissement des mitochondries. Il dépend probablement de structures ou de cofacteurs qui, par vieillissement, s'altérent ou diffusent hors des mitochondries.

L'effet inhibiteur des polypeptides antidiurétiques sur le gonflement osmotique des mitochondries est hautement sélectif. Tandis que l'absorption d'eau est ralentie, la diffusion du potassium, du sodium et de l'acide adénosine-5′-triphosphorique n'est que peu ou pas du tout modifiée.

3. Description d'une méthode biologique de dosage des polypeptides antidiurétiques. L'effet antidiurétique chez le rat est utilisé comme critère de mesure. A la différence des procédés actuellement en usage, les animaux sont opératoirement préparés de telle manière que le dosage peut ensuite être effectué quasi à l'insu de l'animal. Il en résulte une amélioration considérable de la sensibilité et de l'exactitude du dosage des polypeptides antidiurétiques.

Schrifttum

1. Davoll, H., Turner, R. A., Pierce, J. G., und Du Vigneaud, V.: J. Biol. Chem. **193,** 363 (1951). — 2. Kunkel, H. G., Taylor, S. P. Jr., und Du Vigneaud, V.: J. Biol. Chem. **200,** 559 (1953). — 3. Livermore, A. H., und Du Vigneaud, V.: J. Biol. Chem. **180,** 365 (1949). — 4. Mueller, J. M., Pierce, J. G., Davoll, H., und Du Vigneaud, V.: J. Biol. Chem. **191,** 309 (1951). — 5. Mueller, J. M., Pierce, J. G., und Du Vigneaud, V.: J. Biol. Chem. **204,** 857 (1953). — 6. Pierce, J. G., und Du Vigneaud, V.: J. Biol. Chem. **182,** 359 (1950). — 7. Pierce, J. G., und Du Vigneaud, V.: J. Biol. Chem. **186,** 77 (1950). — 8. Pierce, J. G., Gordon, S., und Du Vigneaud, V.: J. Biol. Chem. **199,** 929 (1952). — 9. Popenoe, E. A., und Du Vigneaud, V.: J. Biol. Chem. **205,** 133 (1953). — 10. Ressler, C., Trippett, S., und Du Vigneaud, V.: J. Biol. Chem. **204,** 861 (1953). — 11. Roberts, C. W. und Du Vigneaud, V.: J. Biol. Chem. **204,** 871 (1953). — 12. Taylor, S. P. Jr., Du Vigneaud, V., und Kunkel, H. G.: J. Biol. Chem. **205,** 45 (1953). — 13. Turner, R. A., Pierce, J. G., und Du Vigneaud, V.: J. Biol. Chem. **193,** 359 (1951). — 14. Turner, R. A., Pierce, J. G., und Du Vigneaud, V.: J. Biol. Chem. **191,** 21 (1951). — 15. Du Vigneaud, V., Ressler, C., und Trippett, S.: J. Biol. Chem. **205,** 949 (1953). — 16. Du Vigneaud, V., Ressler, C., Swan, J. M., Roberts, C. W., Katsoyannis, P. G., und Gordon, S.: J. Amer. Chem. Soc. **75,** 1879 (1953). — 17. Du Vigneaud, V., Lawler, H. C., und Popenoe, E. A.: J. Amer. Chem. Soc. **75,** 4880 (1953). — 18. Bargmann, W.: Klin. Wschr. **1949,** 617. — 19. Bargmann, W.: Mikroskopie **5,** 289 (1950). — 20. Bargmann, W., Hild, W., Ortmann, P., und Schiebler, T. H.: Acta neuroveget. **1,** 233 (1955). — 21. Hild, W., und Zetler, G.: Experientia **7,** 189 (1951). — 22. Hild, W., und Zetler, G.: Arch. exper. Path. Pharmak. **213,** 139 (1951). — 23. Hild, W., und Zetler, G.: Klin. Wschr. **1952,** 433. — 24. Hild, W., und Zetler, G.: Pflügers Arch. Physiol. **257,** 169 (1953). — 25. Zetler, G.: Arch. exper. Path. Pharmak. **218,** 116 (1953). — 26. Zetler, G.: Arch. exper. Path. Pharmak. **218,** 239 (1953). — 27. Trendelenburg, P.: Klin. Wschr. **1928,** 1679. — 28. Sato, G.: Arch. exper. Path. Pharmak. **131,** 45

(1928). — 29. Bargmann, W., und Scharrer, E.: Amer. Scientist **39,** 255 (1951). — 30. Leveque, T. F., und Scharrer, E.: Endocrinology **52,** 436 (1953). — 31. Scharrer, E., und Scharrer, B.: In „Handbuch der mikroskop. Anatomie des Menschen" **6,** 953. Springer-Verlag, Berlin. — 32. Verney, E. B.: Proc. Roy. Soc. Lond. B **135,** 25 (1947). — 33. Starling, E. H., und Verney, E. B.: Proc. Roy. Soc. Lond. B **97,** 321 (1925). — 34. Verney, E. B.: Proc. Roy. Soc. Lond. B **99,** 487 (1926). — 35. Theobald, G. W.: J. Physiol. **34,** 243 (1934). — 36. Janssen, S.: Arch. exper. Path. Pharmak. **135,** 1 (1928). — 37. Hondovsky, H., und Samaan, A.: J. Physiol. **89,** 14 (1937). — 38. Wakim, K. G., Herrick, J. F., Baldes, J., und Mann, F. C.: J. Clin. Lab. Med. **27,** 1013 (1942). — 39. Walker, A. M., Schmidt, C. F., Elsom, K. A., und McDowell, M. C.: J. Physiol. **134,** 580 (1941). — 40. Sinclair-Smith, B. C., Sisson, J., Kattus, A. A., Genecin, A., Monge, C., McKeever, W., und Newman, E. V.: Bull. Johns Hopkins Univ. **87,** 221 (1950). — 41. Shannon, J. A.: J. Exper. Med. **76,** 387 (1942). — 42. Burgess, W. W., Harvey, A. M., und Marshall, E. K.: J. Pharmacol. Exper. Therap. **49,** 237 (1933). — 43. Darmady, E. M.: In „The Kidney". Ciba Found. Symp. Lond. **1954,** S. 27. — 44. West, C. D., Kaplan, S. A., Fomon, S. J., und Rapoport, S.: J. Physiol. **170,** 239 (1952). — 45. Wesson, L. G., und Anslow, W. P. Jr.: J. Physiol. **170,** 255 (1952). — 46. Smith, H. W.: The Kidney. Structure and Function in Health and Disease. New York 1951. — 47. Hargitay, B., und Kuhn, W.: Zschr. Elektrochem. **55,** 539 (1951). — 48. Wirz, H., Hargitay, B., und Kuhn, W.: Helvet. physiol. acta **9,** 196 (1951). — 49. Wirz, H.: Helvet. physiol. acta **11,** 20 (1953). — 50. Wirz, H.: Helvet. physiol. acta **14,** 353 (1956). — 51. Wirz, H.: 3. Freiburger Symp. 1954. Springer-Verlag, Berlin. — 52. Hogeboom, G. H., Schneider, W. C., und Pallade, G. E.: J. Biol. Chem. **172,** 619 (1948). — 53. Claude, A.: J. Exper. Med. **84,** 51 (1946). — 54. Kelsall, A. R.: J. Physiol. **109,** 150 (1949). — 55. O'Connor, W. J., und Verney, E. B.: Quart. J. Exper. Physiol. **31,** 393 (1942). — 56. Schreiber, I.: Cast. Prac. Lek. **2,** 153 (1950). — 57. Van Dyke, H. B.: Renal Function. Josiah Macy Jr. Found., New York 1950. — 58. Jeffers, W. A., Livezey, M. M., und Austin, J. H.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **50,** 184 (1942). — 59. Ralli, E. P., Raisz, L. G., Leslie, S. H., Dumm, M. E., und Laken, B.: J. Physiol. **163,** 141 (1950). — 60. Heller, H., und Blackmore, K. E.: Endocrinology **8,** 224 (1952). — 61. Gibbs, O. S.: J. Pharmacol. Exper. Therap. **40,** 129 (1930). — 62. Burn, J. H.: Quart. J. Pharmacy **4,** 517 (1931). — 63. Theobald, G. W.: Clin. Sci. **1,** 225 (1934). — 64. Gilman, A., und Goodman, L.: J. Physiol. **90,** 113 (1937). — 65. Walker, A. M.: J. Physiol. **127,** 519 (1939). — 66. Robinson, F. H., und Farr, L. E.: Ann. Int. Med. **14,** 42 (1940). — 67. Hickey, R. C., Hare, K., und Hare, R. S.: Anat. Rec. **81,** 319 (1941). — 68. Anselmind, K. J., Hoffmann, F., und Kennedy, W. P.: Edinburgh Med. J. **39,** 376 (1932). — 69. Ham, G. C., und Landis, E. M.: J. Clin. Invest. **21,** 455 (1942). — 70. Ham, G. C.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **53,** 210 (1943). — 71. Hare, K., Melville, E. V., Chambers, G. H., und Hare, R. S.: Endocrinology **36,** 323 (1945). — 72. Fugo, N. W., und Aragon, G. T.: Fed. Proc. **6,** 330 (1947). — 73. Lindquist, K. M., und Rowe, L. W.: J. Amer. Pharm. Ass. **33,** 227 (1949). — 74. Birnie, J. A., Eversole, W. J., Boss, W. R., Osborn, C. M., und Gaunt, R.: Endocrinology **47,** 1 (1950). — 75. Ames, R. G., Moore, D. H., und Van Dyke, H. B.: Endocrinology **46,** 215 (1950). — 76. Leaf, A., und Mamby, A. R.: J. Clin. Invest. **31,** 54 (1952). — 77. Ginsburg, M.: Brit. J. Pharmacol. **5,** 411 (1951). — 78. Stein, M., Jinks, R., und Mirsky, I. A.: Endocrinology **51,** 492 (1952). — 79. Ginsburg, M., und Heller, H.: J. Endocrinology **9,** 267 (1953). — 80. Dicker, S. E.: J. Physiol. **122,** 149 (1953). — 81. Giere, F. A.: Proc. Iowa Acad. Science **64,** 629 (1957). — 82. Buchborn, E.: Z. ges. exper. Med. **125,** 614 (1955). — 83. Still, J. W., und Whitcomb, E. R.: J. Lab. Clin. Med. **48,** 152 (1956). — 84. Prigge, R., und Schäfer, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **191,** 281 (1939). — 85. Prigge, R.: Naturw. **25,** 169 (1937). — 86. Bisset, G. W., und Walker, J. M.: J. Physiol. **126,** 588 (1954). — 87. Heim, F., Leuschner, F., und Wunderlich, G.: Klin. Wschr. **1957,** 823. — 88. Schneider, W. C.: J. Biol. Chem. **176,** 259 (1948). — 89. Bartley, W., und Davies, R. E.: Bio-

chem. J. **53,** 37 (1953). — 90. Mosher, R. E., Boyle, A. J., Bird, E. J., Jacobson, S. D., Batchelor, T. M., Iseri, L. T., und Myers, G. B.: J. Clin. Path. **19,** 461 (1949). — 91. Bücher, T.: Adv. Enzymol. **14,** 1 (1953). — 92. Katsoyannis, P. G.: J. amer. chem. Soc. **79,** 109 (1957). — 93. Fisher, R. A.: Statistical Methods for Research Workers. Oliver & Boyd, Edinburgh 1928. — 94. Burn, H. J.: Biologische Auswertungsmethoden. Springer-Verlag, Berlin 1937. — 95. Heller, H., und Zaidi, S. M. A.: Brit. J. Pharmacol. **12,** 284 (1957). — 96. Lehninger, A. L.: Physiologia of Mitochondria (Übersicht) in „Enzymes: Units of Biological Structure and Function". Academic Press Inc., New York 1956. — 97. Raaflaub, J.: Helvet. Physiol. Acta **11,** 142 (1953). — 98. Brenner-Holzach, O., und Raaflaub, J.: Helvet. Physiol. Acta **12,** 242 (1954). — 99. Ginsburg, M., und Heller, H.: J. Endocrinology **9,** 283 (1953). — 100. Dicker, S. E.: J. Physiol. **124,** 464 (1954). — 101. Crawford, J. D., und Pinkham, B.: Endocrinology **55,** 699 (1954). — 102. Ginsburg, M.: Zit. bei H. Heller in „The Neurohypophysis". Proc. Colston Res. Soc., 8th Symp., Butterworth, London 1957. — 103. Heubner, W.: Kongr. Therapeut. Union, Bern 1937. — 104. Heller, H., und Urban, F. F.: J. Physiol. **85,** 502 (1935), **89,** 81 (1937),. — 105. De Cuve, C., und Berthet, J.: J. Intern. Rev. Cytol. **3,** 225 (1954). — 106. Pallade, G. E.: Electron Micrscopy of Mitochondria and other Cytoplasmatic Structures in „Enzymes: Units of Biological Structure and Function". Academic Press Inc., New York 1956. — 107. Bartley, W., und Davies, R. E.: Biochem. J. **53,** 37 (1953). — 108. Berthet, J., Berthet, L., Appelmans, F., und De Duve, C.: Biochem. J. **50,** 182 (1952). — 109. Fonnesu, A., und Davies, R. E.: Biochem. J. **61,** VI—VII (1955). — 110. Cutting, M., und McCance, R. A.: J. Physiol. **104,** 288 (1946), **105,** 205 (1946). — 111. Sjöstrand, F. S.: Nature (Lond.) **171,** 30 (1953). — 112. Leuthardt, F., und Exer, B.: Helvet. chim. acta **36,** 500 (1953). — 113. Andersen, B., und Ussing, H. H.: Acta physiol. **39,** 228 (1957). — 114. Tedeschi, H., und Harris, D. L.: Arch. Biochem. a. Biophysics **58,** 52 (1955). — 115. Cleland, K. W., und Slater, E. C.: Quart. J. Microsc. Sc. **94,** 329 (1953). — 116. Lewis, M. R., und Lewis, W. H.: Amer. J. Anat. **17,** 339 (1945). — 117. Costello, D. P.: Physiol. Zool. **12,** 13 (1939). — 118. Harris, D. L.: Biol. Bull. **85,** 179 (1943).